

# **TRABAJO DE FIN DE GRADO DE MEDICINA**

## **PAPEL DEL ETANOL EN COMBINACIÓN CON EL SÍNDROME METABÓLICO SOBRE SISTEMA NERVIOSO CENTRAL**



**Autor: Pablo Pérez Díez**

**Tutor: María Muriach Saurí**





## **TRABAJO DE FIN DE GRADO (TFG) - MEDICINA**

**EL/LA PROFESOR/A TUTOR/A** hace constar su **AUTORIZACIÓN** para la Defensa Pública del Trabajo de Fin de Grado y **CERTIFICA** que el/la estudiante lo ha desarrollado a lo largo de 6 créditos ECTS (150 horas)

**TÍTULO del TFG:** PAPEL DEL ETANOL EN COMBINACIÓN CON EL SÍNDROME METABÓLICO EN SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

**ALUMNO/A:** PABLO PÉREZ DÍEZ

**DNI:** 45799025-E

**PROFESOR/A TUTOR/A:** MARÍA MURIACH SAURÍ

Fdo (Tutor/a): .....

**COTUTOR/A INTERNO/A** (Sólo en casos en que el/la Tutor/a no sea profesor/a de la Titulación de Medicina):

Fdo (CoTutor/a interno): .....



# ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	7
RESUMEN/ABSTRACT.....	9
EXTENDED SUMMARY.....	10
INTRODUCCIÓN.....	13
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	23
MATERIAL Y MÉTODOS.....	25
1. REACTIVOS.....	25
2. EQUIPOS.....	25
3. DISEÑO.....	26
4. TAMAÑO MUESTRAL.....	27
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	36
RESULTADOS.....	39
DISCUSIÓN.....	47
CONCLUSIONES.....	53
LIMITACIONES.....	54
BIBLIOGRAFIA.....	55



## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

**CV** : Cardiovascular

**DM2** : Diabetes mellitus 2

**SM**: Síndrome metabólico

**RI** : Resistencia a la insulina

**ATP III** : Adult Treatment Panel III

**EGIR**: The European Group for the study of Insulin Resistance

**OMS**: Organización Mundial de la Salud

**IDF**: International Diabetes Federation

**TNF-  $\alpha$**  : Factor de necrosis tumoral alfa

**PCR**: Proteína C reactiva

**HDL** : High density lipoprotein

**DM** : Diabetes Mellitus

**DM1** : Diabetes Mellitus 1

**ADH** : Alcohol deshidrogenasa

**ALDH** : Aldehído deshidrogenasa

**AGL** : Ácidos grasos libres

**cAMP** : Adenosín monofosfato cíclico

**ERO** : Especies reactivas de oxígeno

**SNC** : Sistema nervioso central

**MDA** : Monoaldehído

**4-HNE** : 4-hidroxinonenal

**RL** : Radicales libres

**HPLC** : High performance liquid chromatography

**GSH** : Glutati3n reducido

**GSSG** : Glutati3n oxidado

**GPx** : Glutati3n peroxidasa

**GR** : Glutati3n reductasa

**EtOH** : Etanol

**TNB** : 3cido 2-nitro-5-sulfanilbenzoico

**BSA** : Seroalb3mina bovina

**TBA** : 3cido tiobarbit3rico

**Ca<sup>2+</sup>** : Calcio

**AC** : Adenilatociclasa

**GCK** : Glucoquinasa

**Nrf2** : Nuclear related factor 2

**ATP** : Adenos3n trifosfato



## RESUMEN

A pesar de la alta prevalencia del síndrome metabólico y del abuso de etanol, la literatura que analiza su efecto conjunto sobre el sistema nervioso central es escasa. El objetivo de este estudio experimental es estudiar los efectos de ambos combinados sobre el metabolismo de la glucosa y el estrés oxidativo en la corteza cerebral en ratones. Se separaron cuatro grupos (n=48; 12 en cada grupo). El grupo diabético fueron ratones *ob/ob*. Así los grupos fueron: *Control*, *EtOH*, *Ob/ob* y *Ob/ob-EtOH*. No hubo diferencias en la secreción de insulina en los grupos etanol. Tampoco hubo diferencias significativas en las concentraciones de monoaldehído y en la actividad glutatión reductasa. Por otro lado, las concentraciones de glucemia basal y del test de sobrecarga mostraron una disminución significativa en el grupo *Ob/ob-EtOH* respecto a su control *Ob/ob*. La actividad de Glutatión peroxidasa también mostro un aumento en los grupos *EtOH*, *Ob/ob* y *Ob/ob-EtOH*. Se extrae de los resultados que el etanol mejora la sensibilidad a la insulina en el grupo obeso. De los valores de Glutatión peroxidasa concluimos que tanto la obesidad como el consumo de etanol son agentes pro-oxidantes pues aumentan sus valores, sin embargo, los depósitos de MDA no están aumentados posiblemente debido al corto tiempo de exposición al etanol.

## ABSTRACT

Despite the high prevalence of metabolic syndrome and ethanol abuse, the literature analyzing its interaction within central nervous system is unclear. The objective of this work is to study the combined effects of ethanol and metabolic syndrome on glucose metabolism and oxidative stress in mice cerebral cortex. Animals were divided in four groups of study: *Control*, *EtOH*, *Ob/ob* and *Ob / ob-EtOH*. There were no differences in insulin secretion in the ethanol groups. There were also no significant differences in the concentrations of monoaldehyde and glutathione reductase activity. On the other hand, the concentrations of basal glycemia and the overload test showed a significant decrease in the *Ob/ob-EtOH* group with respect to your *Ob/ob* control. The Glutation peroxidase activity also showed an increase in the *EtOH*, *Ob/ob* and *Ob/ob-EtOH* groups. These data would support the idea of ethanol as substance, which improves insulin sensitivity in the obese group. Results obtained from the present study also pointed out that obesity and ethanol are pro-oxidants agents since values of Glutation peroxidase were increased. Conversely, MDA deposits are not increased possibly due to the short time of exposure to ethanol.

## EXTENDED SUMMARY

### Introduction

Metabolic syndrome (MS) is a pathology with a high prevalence in the population of developed countries, even in the infant population. The MS diagnosis is a sum of conditions around obesity and insulin resistance, such as abdominal obesity, dyslipidemia, insulin resistance, arterial hypertension, prothrombotic state and a proinflammatory state. Moreover, MS is a precursor of cardiovascular disease and diabetes mellitus 2 (DM2). In the pathophysiology of DM2 there is a decrease in glucose uptake by the cells when stimulated by insulin.

Ethanol abuse is another big health problem, for example, it accounts for 5.9% of all deaths and also has serious economic and social consequences, possible associated mental disorders and the development of DM2.

The relationship between both pathologies is uncertain in the literature. There are several studies that show a positive association and others that show a protective effect in moderate ethanol consumption for the development of MS. Oxidative stress is found in the mechanisms that explain the transition of pancreatic beta cells to a diabetic state.

In relation to the central nervous system (CNS), diabetes and ethanol abuse are capable of producing cognitive alterations. However, the combined effect of the two remains to be understood. It is known that DM2 and ethanol are both oxidative threatening agents. This leads to a decrease in antioxidant molecules and enzymes and an increase in lipid peroxidation products. The glutathione system is the most important antioxidant system, it is regulated by the enzymes glutathione peroxidase and glutathione reductase. MDA is the main product of lipid peroxidation. The main objective of this project is to know the effects of ethanol abuse in the CNS of MS animals with special focus on the oxidative system.

### Material and methods

C57BL / 6 mice were used as control and ob / ob mice as models of MS. All mice were subjected to the same environmental conditions. Animals were divided in 4 experimental groups: *Control*, *EtOH*, *Ob / ob* and *Ob / ob-EtOH* (n = 48). Animal weight was monitored during the experiment.

Baseline glycemia were determined once a week. A glucose overload test was performed and glycemic levels were measured at 0, 30, 60, and 120 min. At the end of the experiment, insulin plasma concentration was measured.

For antioxidant defenses, GR and GPx activity were measured by spectrophotometry. The MDA was determined using the TBARS assay and with the help of HPLC. The method described by Bradford was used for protein quantification.

The statistical analysis was performed using the SPSS v24 software for Windows. The arithmetic mean was the measure of central tendency and the standard error of the mean the measure of dispersion. The differences were analyzed using one-way ANOVA for a single independent variable. For the determinations in time, a general linear model of repeated measurements was used.

## Results

There is a significant weight difference between control strain and the ob/ob mice. The insulin values were significantly higher in the ob/ob mice, but no differences were found in the ethanol consumption groups. The *Ob / Ob* group, showed statistically significant decrease in the glycemic levels of the *Ob/ob EtOH* group was obtained in both tests.

The results of the MDA did not reveal significant differences in cortex. Regarding the glutathione system, the GR did not show differences between all the groups of the study. However, the GPx was increased in the *EtOH*, *Ob/ob* and *Ob/ob-EtOH* mice, showing a significant difference with the control group.

## Discussion

This study is important because there is no literature that links the combined effect of MS and ethanol abuse on the CNS. It has been shown that there is a great body of evidence between obesity-insulin resistance and MS. Thus, the use of the ob/ob line with a mutation in the leptin gene can be used as a MS model. Our results showed increased insulin levels as expected in an insulin resistance situation. Ethanol consuming groups did not show any differences on insulin secretion. Baseline glycemia and glucose overload tests revealed a significant decrease in the *Ob / ob-EtOH* group when compared to its respective control. This indicates that ethanol seems to improve

insulin sensitivity in diabetic mice. In the glutathione system, GPx increased levels seem to respond to a free radical increase both in obese mice and in groups consuming ethanol. The GR does not show significant differences, which could be interpreted as a possible imbalance of the metabolism of the glutathione system. The MDA determined by the HPLC did not reveal significant differences. This may indicate that the antioxidant system is still able to compensate the ethanol-induced oxidative stress. At this respect, it would be possible to find a situation of lipid peroxidation increase due to the failure of the cellular defense machinery to overcome the ethanol-induced oxidative stress. We can conclude that ethanol in this period of time does not cause significant variations in the weights and insulin secretion. Ethanol consumption in diabetic subjects seems to improve insulin sensitivity. And that both ethanol and MS induce an increase in antioxidant activity, without overcoming the defensive mechanism during the time-course of the study.

# INTRODUCCIÓN

## Síndrome metabólico

Esta patología se define como un compendio de circunstancias en el centro de las cuales se encuentra la obesidad visceral, tal y como se detalla más adelante. Su importancia clínica y epidemiológica radica en que se considera como un estado precursor y corregible de la enfermedad cardiovascular (CV) y de la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (Shin et al., 2013). El síndrome metabólico (SM) genera un riesgo CV y de DM2 mayor al de la suma de sus condiciones. No obstante, en la práctica clínica todas las condiciones se tratan por separado, excepto las medidas higiénico-dietéticas comunes.

En el contexto epidemiológico hemos de saber que los eventos cardiovasculares constituyen la primera causa de mortalidad, y que la prevención de los factores que forman el SM permite una gran reducción del riesgo CV. En España existen pocos estudios de prevalencia y se supone una variabilidad interregional. No obstante, oscila entre el 19,3% según la definición de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el 15,5% según la definición de *The European Group for the study of Insulin Resistance* (EGIR) y el 14,2% según la del *Adult Treatment Panel III* (ATP III). Se ha constatado además una incidencia creciente en niños y adolescentes (Poyrazoglu et al., 2014), lo que lo convierte en un problema de salud pública de primer nivel.

## Elementos definitorios

Los elementos que constituyen el (SM) son 6: la obesidad abdominal, la dislipemia aterogénica, la insulinoresistencia(RI)/intolerancia a la glucosa, la hipertensión arterial, el estado proinflamatorio y el estado protrombótico.

En cuanto a los criterios diagnósticos de cabe esperar que la laxitud sea grande y son varias las organizaciones/estudios que han fijado dichas condiciones para el diagnóstico. Las más importantes son: OMS, EGIR, ATPIII, la Sociedad Americana de Endocrinología (AACE) y la Federación Internacional de Diabetes (IDF) (Martínez de Morentín et al., 2003).

Con respecto a obesidad y el sobrepeso en su relación con el síndrome, sólo el 6% de los individuos con normopeso cumplen criterios diagnósticos (“normopesos metabólicamente obesos”), hasta el 20% de los pacientes con sobrepeso (IMC entre 25 y 29) y el 60% de los que presentan un IMC  $\geq 35$ . La fuerte conexión entre la obesidad y los factores de riesgo ha llevado al ATPIII a definir el SM esencialmente como una agrupación de complicaciones metabólicas acompañantes de la obesidad (Grundy et al., 2004).

Así la obesidad se relaciona directamente con todos los componentes del síndrome, ya que el tejido adiposo es la fuente de diversas moléculas potencialmente patógenas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-  $\alpha$ ) (Ramírez y Sánchez, 2012). Estas moléculas pueden promover el desarrollo de alteraciones en el perfil lipídico, hipertensión arterial e insulinoresistencia, así como a un estado proinflamatorio reconocido clínicamente por el aumento de la concentración plasmática de la proteína C reactiva (PCR). Ello hace que la relación entre la obesidad y la inactividad física con el SM sea estrecha (Grundy et al., 2004).

En cuanto a la resistencia a la insulina como pilar fundamental del SM existe más controversia ya que, aunque se conozcan bien mecanismos que lo asocian con otros componentes del síndrome, como la dislipemia aterogénica o el estado proinflamatorio, existen otros con los cuales la relación es mucho menos potente, véase la hipertensión arterial o el estado protrombótico (Ascaso et al. 2006).

La RI y su consecuencia, el hiperinsulinismo, son causa directa en mayor o menor medida de diversos factores de riesgo metabólicos, como el aumento de los triglicéridos plasmáticos, el

descenso de cHDL, la hipertensión arterial o la hiperglucemia. Aun así, el SM puede haberse establecido ya 10 años antes de la detección de las alteraciones del metabolismo de la glucosa (Grundy et al., 2004). Este hecho identifica fuertemente al SM como un estado prediabético que supone un gran riesgo para su desarrollo.

## **Diabetes Mellitus**

La Diabetes Mellitus (DM) es una patología compleja con afectación del metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos. Existen dos grandes vertientes etiopatogénicas que dan lugar a sus dos grandes tipos, aunque todas comparten como signo cardinal unos niveles de glucosa en sangre elevados. Este aumento de glucosa tiene como consecuencia complicaciones tanto a largo como a corto plazo. Afectan principalmente a órganos con microvasculatura como lo son los ojos, los nervios, el corazón o los riñones.

El primero de estos tipos es la Diabetes Mellitus 1 (DM1), en la que el factor etiológico se basa en la destrucción de las células Beta pancreáticas por un mecanismo autoinmune lo que conlleva un déficit de insulina. Es también conocida como Diabetes insulino dependiente.

La Diabetes Mellitus tipo 2 tiene como clave fisiopatológica una disminución de absorción de glucosa por parte de las células del tejido periférico frente al estímulo de la insulina (Zimmet et al; 2001; Stumboll et al 2005). Este tipo constituye el 90% de los casos presentándose en sujetos con resistencia a la insulina. La prevalencia mundial casi se ha duplicado desde 1980 hasta estimarse a día de hoy en torno a un 9% de la población.

Existen dos grandes grupos de factores de riesgo para el desarrollo de DM2: los no modificables y los modificables. Los primeros son condiciones como la dotación genética, el origen étnico o la edad. Los modificables son aquellos sobre los que tenemos que fijar la atención en el campo de la prevención. Son el sobrepeso y la obesidad, la mala alimentación, una pobre actividad física, el alcoholismo o el tabaquismo entre ellos. Las medidas de prevención se basan en la corrección de

estos factores mediante medidas como una dieta equilibrada baja en grasas y azúcares refinados, una actividad física regular y una abstinencia de hábitos tóxicos (OMS, 2016).

El consumo de alcohol étílico en particular es un factor de riesgo que, en sí mismo, ya genera un gran impacto en la salud pública. Según la OMS, cada año se producen 3,3 millones de muertes en el mundo debido al consumo excesivo de etanol, lo que representa un 5,9% de todas las defunciones. Sin embargo, si nos centramos en el grupo etario entre 20 y 39 años, las cifras se tornan aún más alarmantes atribuyendo al etanol hasta un 25% de las defunciones. Todo esto sin tener en cuenta los posibles trastornos mentales asociados, ni las consecuencias sociales y económicas.

### **Relación entre SM y abuso de etanol**

El paradigma actual de esta cuestión se muestra incierto. En términos de estudios poblacionales los resultados no son nada concluyentes. Existen estudios que apoyan un factor protector en el consumo moderado de etanol en el desarrollo de diabetes tipo 2 (Koloveryou et al. 2014; Koppes LL et al. 2005; Fromenty et al., 2009), mientras que otros defienden una asociación positiva entre el consumo alcohólico y el desarrollo de alteración en la secreción de insulina y de resistencia a ella (Marques-Vidal P. 2015; Tatsumi Y. et al. 2017)

Existen distintos factores respecto al consumo de bebidas alcohólicas que podrían suponer variables de confusión a la hora de realizar estos estudios. Entre ellas, existe un gran déficit en la homogeneidad en los valores que definen cada grupo de consumo, esto significa que el grupo de consumo moderado en un estudio puede incluir gente que en otro estaría incluida en el de alto o bajo consumo. Además, se ha observado que la mayor proporción de fumadores por grupos suele aparecer en el de más alto consumo (Ruderman N 1998), pudiendo ser la combinación alcohol-tabaco la responsable de los efectos y no únicamente un efecto de un consumo más elevado de etanol. Por otro lado, el consumo moderado de etanol forma parte de la dieta mediterránea, la cual ha sido demostrada como un factor de protección frente al desarrollo de SM.



Independientemente de los beneficios que aporta la dieta mediterránea, un patrón de consumo moderado suele ir ligado a unos hábitos alimenticios regulares, lo cual ayudaría a prevenir el desarrollo de diabetes. Existen estudios que atribuyen los efectos observados al factor frecuencia de consumo, por encima de la cantidad ingerida (Heianza Y. et al. 2013; Holst C. et al. 2017). Otros postulan también el posible efecto del tipo de bebida alcohólica, aunque dichas investigaciones no son muy concluyentes (Holst C. et al. 2017). Asimismo, se ha planteado la influencia de variables genéticas respecto al metabolismo del etanol por la alcohol deshidrogenasa (ADH) y la aldehído deshidrogenasa (ALDH), que podrían afectar a estos estudios poblacionales ya que es conocida la disminución de estas enzimas en determinados grupos de población, véase asiáticos (Chiang CP. et al. 2009).

Asimismo, tal y como se ha mencionado anteriormente, la obesidad junto con la resistencia a la insulina supone la principal causa subyacente para el desarrollo de SM (Roberts et al. 2013). Las causas de esta RI son los factores de riesgo modificables comentados previamente en el riesgo de DM2, aunque el factor genético puede atenuar o exacerbar dichas condiciones (Roberts et al., 2013). Se ha demostrado que una exposición prolongada de los islotes pancreáticos de rata a ácidos grasos libres (AGL) inhibe la síntesis y secreción de insulina inducida por la glucosa (Zhou et al., 1994). A su vez se ha demostrado que la ingesta continua de etanol correlaciona positivamente con el desarrollo de obesidad abdominal (Bergmann et al., 2011), y que el metabolismo del etanol induce un aumento de la concentración de AGL, así como un aumento de la lipogénesis, debido al incremento de la sintasa de ácidos grasos (Kim et al., 2015). No obstante, otros estudios concluyen que la ingesta de etanol disminuye los niveles de Fetuina-A y aumenta los de colesterol HDL y adiponectina los cuales son factores protectores para el desarrollo de SM (Wassel et al., 2008; Joline et al. 2012).

Por lo tanto, los mecanismos por los cuales el abuso de etanol se relaciona con el desarrollo de SM son complejos. El etanol agudo actúa de forma directa sobre la célula mediante un aumento de AMPc vía dependiente de calcio (Baliño et al. 2015). Esto puede modificar el flujo de calcio intraplasmático a expensas de liberar depósitos internos (Verkhatsky, 2005; Kelm et al.; 2007;

Park et al., 2008; Daniell y Harris, 1989; Xiao et al., 2005) mediante su acción en los receptores del retículo endoplasmático (Ryanodina y IP3). El consumo de etanol pues, agravaría la resistencia a la insulina. Aunque este proceso no es capaz de justificar la transdiferenciación de las células beta o el paso a estadios diabéticos de éstas (Yagihashi, Inaba y Mizukami, H. 2016).

Por otro lado, entre los mecanismos fisiopatológicos que explican el desarrollo de SM se encuentran el estrés oxidativo (EO), los procesos inflamatorios y una sobreactivación del sistema simpático (Shin et al. 2013), todos ellos relacionados con la sobrenutrición y el exceso de ácidos grasos. Esto deriva en la producción de productos de peroxidación lipídica, ceramidas y especies reactivas de oxígeno (ERO) que son capaces de inducir apoptosis y muerte de las células beta (Hayden & Tyagi., 2002). Hay que destacar, que al etanol es capaz también de producir estrés de retículo, disfunción mitocondrial y producción de EO en diversos órganos y tejidos, dando lugar incluso a la aparición de resistencia a la insulina (Kim et al. 2015).

### **Consumo de etanol y SM en la aparición de alteraciones cognitivas y daño del sistema nervioso central (SNC).**

En relación al SNC, se ha descrito que el abuso de etanol da lugar al desarrollo tanto de demencias como de alteraciones cognitivas (Gupta & Warner, 2008; Kuzma et al., 2014; Naqvi & Morgenstern, 2015). Asimismo, la diabetes también ha demostrado la capacidad de provocar alteraciones estructurales, neurofisiológicas y conductuales, acompañadas por disfunciones en la neurotransmisión (Biessels et al., 1994; Muriach et al., 2006). El estado del cerebro diabético se ha definido como un estado de envejecimiento prematuro (Biessels et al., 2002). No solo la DM sino también el SM se ha asociado a alteraciones cognitivas (Mellendijk et al., 2015; Walker & Harrison, 2015; Wang et al., 2016).

La acción de la insulina en el SNC incluye funciones como la regulación de la ingesta, del peso corporal, distribución de tejido adiposo y una larga serie de procesos metabólicos (Heni et al., 2015). Esta hormona no solo induce efectos sobre áreas que regulan la homeostasis y el control

metabólico, sino también afectan zonas como la corteza prefrontal y el hipocampo, relacionadas con procesos sensoriales y cognitivos. La administración intranasal de insulina mejora la formación de memoria tanto en pacientes sanos como diabéticos o afectados por enfermedades neurodegenerativas (Benedict et al., 2004; Ott et al., 2012; Freiherr et al., 2013; Novak et al., 2014; Yarchoan & Arnold., 2014).

Sin embargo, aun existiendo evidencias sobre el alcoholismo y la resistencia a la insulina por separado como condiciones negativas sobre el SNC, no se encuentran estudios que evalúen los efectos combinados sobre éste.

### **Mecanismos comunes**

Tanto el abuso de etanol como el SM cursan con mecanismos de acción y efectos similares sobre el SNC. Ambos reducen la defensa antioxidante e incrementan la producción de ERO (Muriach et al., 2006; Cai&Liu., 2012; Almansa et al., 2013) alterando el equilibrio oxidativo. El alto requerimiento de oxígeno y su riqueza en ácidos grasos convierten al cerebro a un órgano especialmente vulnerable a estos mecanismos de deterioro. Se ha descrito la formación de productos de la peroxidación lipídica como el monoaldehído (MDA) e hidroxialquenos como el 4-hidroxinonenal (4-HNE), tanto en pacientes con SM y DM como en el abuso de etanol (Miranda et al., 2007; Johnsen-Soriano et al., 2007). Dichos compuestos forman aductos que dañan ADN y proteínas, estos agregados son capaces de formar los denominados agregomas (cuerpos de inclusión perinucleares formados por proteínas mal plegadas y pudiendo aparecer ubiquitinados) que están incluidos en la patogénesis de multitud de patologías (Johnston et al., 1998) e íntimamente ligados a la producción de ERO (Marambio et al., 2010).

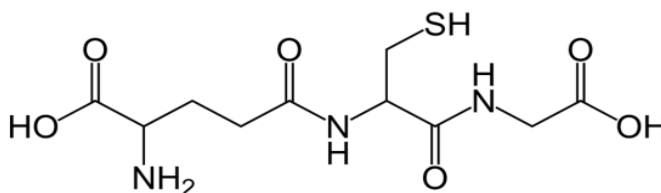
Los procesos inflamatorios tanto agudos como crónicos están asociados a alteraciones redox y generación de EO (Biswas, 2016). Las moléculas proinflamatorias estimuladas por el EO también ejercen daño sobre el SNC (Yang et al., 2014; Bocarsly et al., 2015).

Contra el desequilibrio redox que provoca EO, existen una serie de mecanismos que tratan de mantener dicho equilibrio y se conocen como “sistema antioxidante”. Se entiende por sistema antioxidante el conjunto de compuestos moleculares, sistemas enzimáticos y compuestos antioxidantes y pro-antioxidantes que controlan el equilibrio REDOX a nivel celular, retrasando, previniendo o eliminando el daño oxidativo causado a una molécula diana (Halliwell, 2007).

Estos antioxidantes se dividen en tres grandes grupos:

- Antioxidantes primarios: los cuales se encargan de prevenir la formación de radicales libres (RL). Entre ellos se incluyen la catalasa o la glutatión peroxidasa.
- Antioxidantes secundarios: estos son protectores no enzimáticos que actúan ante una sobreproducción de radicales que ya ha superado el equilibrio redox. Previenen las reacciones en cadena. Son algunos de ellos el glutatión, la vitamina E, la vitamina C, el ácido úrico, la bilirrubina y la albúmina (Finaud et al., 2006).
- Antioxidantes terciarios: que actúan sobre el daño ya originado por los RL e impiden su acumulación. Estos a su vez se pueden dividir en reparadores directos o indirectos.

El glutatión se considera la molécula antioxidante endógena más importante. Su estructura química le confiere muchas posibilidades para desempeñar sus funciones fisiológicas, ya que el grupo tiol (-SH) de la cisteína le proporciona capacidad para intervenir en reacciones redox, mediante el intercambio de electrones a través del azufre de la cisteína y por otro lado, el enlace  $\gamma$ -glutamilo le confiere resistencia frente a la degradación por las peptidasas (Meister y Anderson, 1983).

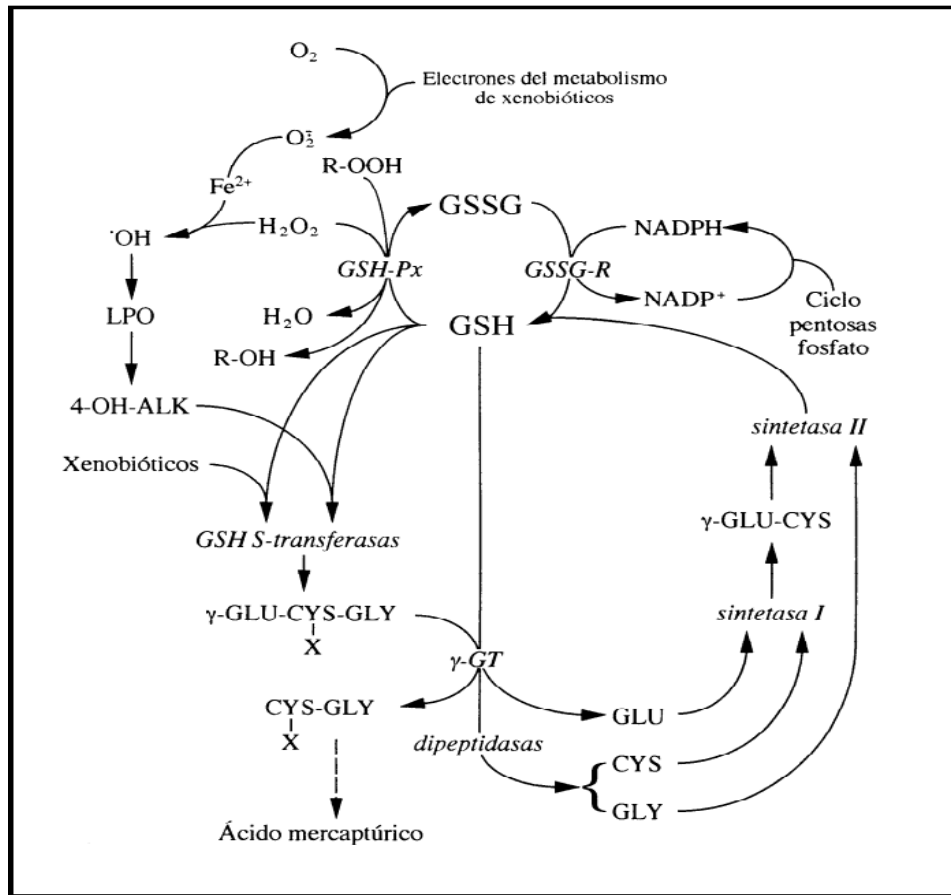


**Figura 1.** Molécula de Glutatión(GSH)

El sistema glutatión está formado por el glutatión y todas las enzimas que están relacionadas con su metabolismo y se encargan de mantener su estado redox (Meister & Anderson, 1983). Lo podemos encontrar de dos formas: reducida (GSH) u oxidada (GSSG) que está formado por dos moléculas GSH unidas por un puente disulfuro. Su forma activa es la reducida y gran parte de sus funciones se deben a la presencia del grupo tiólico reducido que le confiere la cisteína. Su formación es expensas de cisteína con lo que la falta de disponibilidad de esta es la limitación principal. Es capaz de interaccionar con los RL y estabilizar radicales como el hidroxilo, el superóxido y los peróxidos, lo puede hacer reaccionando directamente con los RL, o bien por medio de la glutatión peroxidasa (GPx) para reducir los peróxidos formados (Wefers & Sies, 1983; Sies, 1999, Masella et al., 2005).

La GPx cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno y los hidroperóxidos orgánicos hasta agua y etanol, respectivamente, utilizando como donador de electrones, al glutatión reducido. Aunque existe actividad GPx en la matriz mitocondrial, su mayor actividad se encuentra en el citoplasma. El GSSG fruto de esta reacción se reduce al instante a GSH de nuevo mediante la glutatión reductasa (GR) cuya acción es dependiente de NADPH. Este último es proporcionado por la glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa.

Algunos autores defienden que el equilibrio GSH-GSSG es el principal determinante del estado oxidativo (Waly et al., 2012).



**Figura 2. Metabolismo del sistema Glutación**

## **HIPÓTEIS Y OBJETIVO**

### **Hipótesis**

El consumo crónico de etanol en modelos de ratones con SM es capaz de inducir alteraciones metabólicas y bioquímicas en el SNC, más específicamente en el estrés oxidativo.

### **Objetivo general**

Estudiar el efecto que tiene un consumo crónico de etanol sobre el tejido nervioso central en modelos animales con SM.

### **Objetivos específicos**

Analizar las alteraciones que el etanol produce en el metabolismo de la glucosa en modelos con SM.

Caracterizar las alteraciones que el etanol produce sobre el SNC, más específicamente su papel en el EO.





## MATERIAL Y MÉTODOS

### REACTIVOS

Los reactivos para las soluciones tamponadas, enzimas, coenzimas, son proporcionados por Sigma-Aldrich Corporation (St Louis, MO, USA) y por Boehringer Mannheim (Alemania). El agua utilizada en las determinaciones es de grado Milli-Q (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA).

### EQUIPOS

- **Cromatógrafo líquido de alta presión (Agilent Technologies, Santa Clara, California ):**

- Bomba cromatográfica: Agilent Technology 1100 series binary HPLC Pump.
- Degasificador Agilent Technology de fases móviles serie 1100.
- Detector de fluorescencia FLD Agilent Technology 1200 con celda de 8µL.
- Detector de Diodos (DAD) Agilent Technology 1100 series .
- Inyector Agilent Technology 1050 con loop de 100 µl.
- Ordenador IBM Windows 2000 Pro (Microsoft corporation, Redmond, WA).
- Software: HP ChemStation.

- **Espectrofotómetro** Lambda 25 (Perkin Elmer, Waltham, MA )

- **Centrífugas:**

- Centrífuga refrigerada Mikro 220R (Hettich Holding GmbH & Co. oHG , Kirchleugern, Deutschland)
- Centrífuga refrigerada Megafuge 16R (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

- **Balanzas:**

- Balanza de analítica LA611-2264 ( VWR , Radnor, PA ).
- Balanza PGL 6001 ( ADAM Equipment, Oxford, CT).

- **Otros equipos:**

- pHmetro pH700 ( EUTECH Instruments, part of Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) .
  - Homogeneizador: Polytron PT2500e (Kinematica AG, Luzern, Switzerland)
  - Sistemas de tratamientos de agua: Milli-Q Advantage A10 de Millipore (Merk GaA, Darmstadt, Alemania )
  - Baños termostáticos de temperatura regulable de Selecta modelo Tectron 3471300 (J.P. Selecta, Abrera, Barcelona)
  - Placa agitadora termostatzada MB100-4A ( Hangzhou Allsheng Instruments CO, China)
- Microplatereader BENCHMAK (Bio-Rad, Hercules, CA)
- Lector de placas Multiskan FC (T hermo Fisher Scientific, Waltham, MA) .

## **DISEÑO**

El estudio se ha realizado en ratones C57BL/6 y ratones ob/ob macho de 6 semanas de edad. Los ratones ob/ob son ratones C57BL/6J portadores de una mutación en el gen de la leptina, una hormona saciante que inhibe la conducta alimentaria e incrementa el gasto energético. Estos ratones presentan hiperfagia, convirtiéndose en animales obesos, presentando también hiperinsulinemia, RI e hiperlipidemia. Por lo tanto representan un buen modelo para el estudio de la obesidad, y el SM (Pelleymounter et al., 1995; Chua et al., 1996). Todos los animales se sometieron a las mismas condiciones: un ciclo controlado de luz y oscuridad (12/12h), una

temperatura de 23º y una humedad del 60 %. Todos los procedimientos se han llevado a cabo de acuerdo con el European communities council directive y con el decreto real 1201/2005. Los protocolos fueron aprobados por el Comité de Ética de la Institución, ajustándose a la ley española que regula el manejo de los animales de experimentación.

Para obtener el grupo de ratones pertenecientes al grupo alcohólico se ha llevado a cabo el protocolo descrito por Baliño y cols. (Baliño et al.2014). Este método se basa en la ingesta de etanol introducido como disolución en su agua para beber hasta una concentración del 10% y una dieta sólida *ad libitum* durante 6 semanas. La concentración en el agua fue incrementada durante las primeras dos semanas, aumentando la dosis cada 3 días (2% - 4% - 6% - 8% - 10%) hasta finalmente obtener  $10.5 \pm 1.2$  g/kg de peso prorrateando las 6 semanas.

De este modo hemos obtenido cuatro grupos:

- **Grupo Control (*Control*):** Ratones C57BL/6 con dieta control *ad libitum* durante 6 semanas.
- **Grupo Etanol (*EtOH*):** Ratones C57BL/6 con dieta etanol *ad libitum* durante 6 semanas
- **Grupo Síndrome Metabólico (*Ob/ob*):** Ratones ob/ob con dieta control *ad libitum* durante 6 semanas.
- **Grupo Síndrome Metabólico + Etanol (*Ob/ob-EtOH*):** Ratones ob/ob con dieta etanol *ad libitum* durante 6 semanas.

## TAMAÑO MUESTRAL

El tamaño muestral viene determinado especialmente por el estudio comportamental que se realiza en el proyecto donde se incluye este trabajo, y la que se valoran procesos de aprendizaje y memoria mediante test de conducta. A causa de la gran variabilidad obtenida en este tipo de pruebas, se estableció un tamaño muestral de 12 animales por grupo (n=48). Estos animales son utilizados posteriormente para las determinaciones analíticas incluídas en el presente trabajo.

En todos los casos se controló el peso de los animales y se realizarán estudios de glucemia semanalmente y alcoholemia al final del estudio.

Tras realizar los estudios de conducta, los ratones quedaron estabulados toda la noche en ayunas con el objeto de realizar el test de tolerancia a la glucosa la mañana siguiente, previo al sacrificio de los animales, tal y como se describe a continuación. Posteriormente los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se procedió a la extracción de muestras de suero para la determinación de glucemias y concentración sérica de insulina tal y como se describe más adelante. Además de la extracción de suero, se realizó la disección del cerebro para obtener una muestra de corteza frontal. Una vez extraído el tejido se introdujo en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C para su posterior análisis. Las muestras posteriormente se homogenizaron en tampón fosfato pH 7.4 y se realizaron las siguientes determinaciones:

## **DETERMINACIÓN DE LAS GLUCEMIAS**

Las cifras de glucemia serán estudiadas semanalmente. Junto a estas se realizará una medición del peso. Para la determinación glucémica se utiliza un glucómetro ACCU-CHECK (Roche Diagnostics).

## **TEST DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA**

Esta prueba se realiza el día previo al sacrificio de los animales. Los ratones deben estar en ayunas la noche previa. Antes de iniciar el procedimiento se pesan y se determina la glucosa sanguínea en ayunas. Para el test de sobrecarga se inyectan 2g/kg de glucosa intraperitoneal, repitiendo las glucemias a los 60, 90 y 120 minutos. La sangre es extraída mediante una punción venosa.

## DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE INSULINA

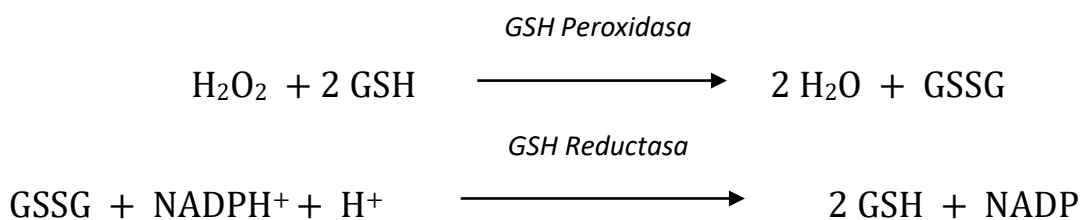
Para la determinación de la insulinemia separamos el suero de la muestra de sangre completa mediante centrifugación dentro de la primera hora y media tras la extracción, y posteriormente se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. La medición se realiza por ensayo microelisa mediante el kit para determinación de insulina en ratón, MERCORDIA mouse insulin ELISA (Mercordia Developing Diagnostics, Suecia) (Schmitz-Peiffer et al., 2007).

## DETERMINACIONES DE LA DEFENSA ANTIOXIDANTE

### Determinación de Glutatión peroxidasa

Para esta determinación se ha utilizado el método descrito por Lawrence (Lawrence et al., 1978) que se basa en las reacciones redox del sistema glutatión.

La glutatión peroxidasa se encarga de catalizar la oxidación del glutatión por el hidróperóxido de cumeno. El glutatión oxidado en presencia de glutatión disulfuroreductasa (GR) y NADPH es reducido continuamente de nuevo a su forma reducida. Esta reacción ocurre a expensas de la oxidación del NADPH, cuyo descenso se monitoriza espectrofotométricamente a una longitud de onda de 340 nm. La diferencia de consumo de NADPH entre el blanco y la muestra determinará la actividad enzimática, la cual será proporcional a la disminución de la absorbancia debido a la desaparición de NADPH.



**Figura 3.** Reacciones catalizadas por GPx y GR

Las soluciones empleadas fueron las siguientes:

- Solución A. Tampón fosfato potásico 0.1 M, pH 7.2, que contiene EDTA 1 mM y azida sódica 1 mM (Sigma, España)
- Solución B. GSH reductasa 2.4 U/mL (Sigma, España)
- Solución C. GSH 10 mM
- Solución D. NADPH 1.5 mM (Roche, España) disuelto en NaHCO<sub>3</sub> al 0.1% (Sigma, España)
- Solución E. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.5 mM (Sigma, España)

Para la ejecución del procedimiento se utilizan microcubetas a las que se añaden sucesivamente las siguientes soluciones:

1. 550 µl de la solución A (tampón fosfato potásico).
2. 2. 50 µl de muestra.
3. 3. 100 µl de la solución de GSH reductasa (solución B).
4. 4. 100 µl de la solución C.

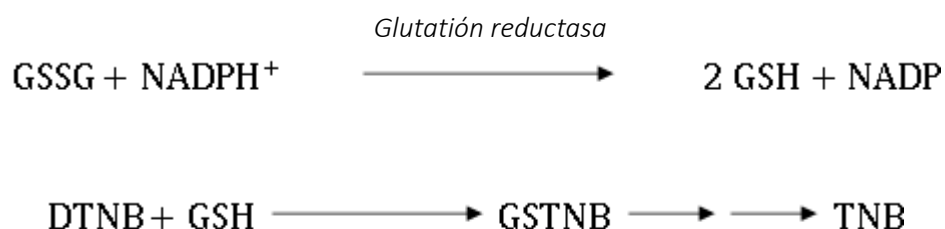
Este producto se preincuba a 37°C durante 5 minutos, entonces se añaden 100 microlitros de la solución D. Tras esto se monitoriza el consumo de NADPH no dependiente de hidroperóxidos usando un espectrofotómetro (Hewlett & Packard modelo 8452A Diode Array) durante 3 minutos. Para finalizar se agregan 100 microlitros de la solución E y se vuelve a registrar la disminución de absorbancia (340 nm) durante 5 minutos, fruto de la disminución de NADPH.

El cálculo se realiza midiendo la diferencia entre los resultados pre-post agregación del hidroperóxido (solución E). Estos tienen en cuenta los volúmenes de las muestras en mL, el coeficiente de extinción molar en nmol x cm<sup>-1</sup>, el paso de luz de la cubeta, la disminución de la absorbancia y el intervalo de tiempo durante la disminución.

Los datos se estandarizan expresando los resultados en nmol de NADPH consumidos por minuto y por mg de proteína.

#### Determinación de Glutación Reductasa

La actividad GR se determinó según el método propuesto por Smith (Smith et al.,1988) en que el GSH reduce al ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB). Se basa en las siguientes reacciones:



**Figura 4.** *Reacción de aparición de TNB.*

El GR se encarga de catalizar la formación de glutatiónreducido(GSH) a partir de glutatiónoxidado(GSSH). Se produce en presencia de NADPH que es oxidado. Si esta reacción se produce en presencia de DTNB, se forma un aducto de glutatión con TNB (GSTNB), que acaba descomponiéndose a TNB (ácido 2-nitro-5-sulfanilbenzoico). La aparición de TNB se registra mediante espectrofotómetro a 412nm.

Las soluciones empleadas en el proceso fueron las siguientes:

- Solución 1. Tampón fosfato potásico 0.2 M, pH 7.5.
- Solución 2. EDTA 10 mM.
- Solución 3. DTNB 3mM en tampón fosfato 10 mM a pH 7,5.
- Solución 4. NADPH 2 mM disuelto en tampón fosfato sódico (sol. 1).
- Solución 5. GSSG 20 mM.

El procedimiento se ejecuta añadiendo de forma sucesiva a una microcubeta las siguientes cantidades de soluciones:

1. 450 microL de la disolución 1.
2. 50 microL de disolución 2.
3. 250 microL de disolución 3.
4. 50 microL de disolución 4
5. 50 microL de disolución 5.
6. 125  $\mu$ L de agua MilliQ
7. 25  $\mu$ L de muestra.

Se obtiene el registro de la aparición de TNB, que implica la generación de GSH, a 412 nm durante 3 minutos.

El cálculo se obtiene por comparación de la pendiente de la recta (Absorbancia(Y)/Tiempo(X)) con la obtenida por un registro previo de calibrado realizado con GR (2,4 U/mL) en sustitución de la muestra:

Punto calibrado	1	2	3	4	5	6
GR ( $\mu$ L)	0	10	20	30	40	50

**Figura 5.** *Calibrado con GR*

La cubeta espectrofotométrica se enrasa con un agua MiliQ hasta llegar a un volumen de 1 mL.

## **DETERMINACIÓN DE DAÑO OXIDATIVO A LÍPIDOS**



## **Determinación MDA**

La cuantificación de monoaldehído de las muestras córtex cerebral se lleva a cabo utilizando una modificación del método de Richard (Richard et al., 1992) llevada a cabo por (Romero et al., 1998). Se determina el complejo MDA con el ácido tiobarbitúrico (TBA), que se basa en la reacción formada por dos moléculas de TBA con una de MDA.

Esta cuantificación se realiza en una columna cromatográfica de separación Kromasil C18 5  $\mu\text{m}$  de 250 x 4,6 mm (Análisis Vínicos S.L.). Con un flujo de base móvil de 1 ml/min, una longitud de onda de excitación de 532 nm y una de emisión de 553nm. El detector de fluorescencia posee un voltaje de 600 y una respuesta de 2 segundos.

La fase móvil se prepara con tampón fosfato 50 mM a pH 6.0 y metanol (580 ml de tampón y 420 ml de metanol). Posteriormente, se filtra a través de un filtro membrana (Scheicher und Schuell) de 0,45  $\mu\text{m}$  de poro y 47 mm de diámetro.

En el procedimiento se utilizan las siguientes soluciones:

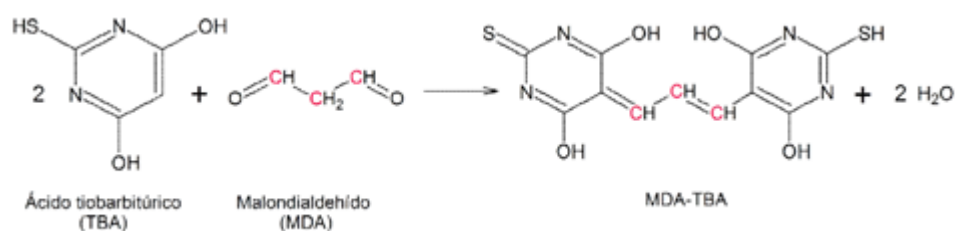
La solución madre de calibración consiste en una concentración 20 mM de 1,1,3,3-tetraetoxipropano en etanol absoluto.

La solución de trabajo consiste en una preparación de TBA (0,37%) y ácido perclórico (6,4%), 2:1 v/v respectivamente.

El proceso empieza en un baño a 95°C durante 60 minutos. Se pipetea en eppendorf de 2 ml 0,1 ml de la muestra y 0,75 ml de la solución de trabajo que una vez bien mezclados se sumergen. Una vez completados los 60 minutos se llevan a una temperatura de 4°C durante 10 minutos con fin de

parar la reacción. Después de ello se centrifugan a 12000 rpm durante otros 10 minutos y las muestras se mantiene a 4°C hasta su inyección en el HPLC.

El aducto TBA-MDA es inestable a pH neutro con lo que se alcaliniza la muestra hasta un pH de 6 antes de inyectarla en el HPLC. Para ello se añaden 0,1 ml de hidróxido potásico 0,7 M a 0,2 de muestra. Una vez neutralizada, la muestra se centrifuga 1 minuto para precipitar las sales insolubles y se filtra con filtros de jeringa no-estériles (3 mm, 20 micras, membrana de teflón, suministrados por Corning Laboratory Sciences Company) previo a la inyección en el HPLC.



**Figura 6.** *Aducto formado por MDA y TBA*

La curva de calibración de estándares se realizó para cada para cada uno de los blancos utilizados (0; 0,25; 0,5; 1 y 2 µM). La concentración de MDA es proporcional al área del pico obtenido en la gráfica, se calcula mediante interpolación en la recta de regresión obtenida en los estándares.

## Cuantificación de proteínas

La determinación de proteínas en las muestras se realiza mediante el método descrito por Bradford (Bradford et al., 1976). Se basa en el empleo de un colorante hidrofóbico cuyas disoluciones en presencia de ácido fosfórico tienen un color pardo y que al encontrarse en el entorno hidrofóbico del interior de las proteínas origina un color azul intenso que se mide mediante espectrofotometría a 595 nm. Esta determinación se compara con la curva de calibración de estándares obtenida previamente usando seroalbúmina bovina (BSA).

Los materiales empleados para el reactivo de Bradford son los siguientes:

- Azul de Coomasie G-250 5 mg

- Etanol 2,5 ml

- Ácido fosfórico 5 ml

- Agua Mili Q hasta 50 ml

Para generar la curva de calibración de estándares empleamos concentraciones albúmina desde 0 a 60 microgramos; enrasando cada tubo hasta 300 microL. Usamos para las distintas concentraciones de BSA un volumen adecuado de una solución madre 1 mg/ml más el volumen de agua necesario. Se muestra en la siguiente tabla.

µg (prot)	0	10	20	30	40	50	60
µl (alb)	0	10	20	30	40	50	60
µl (agua)	300	290	280	270	260	250	240
µl total	300	300	300	300	300	300	300

**Figura 7.** Calibrado con BSA.

Una vez elaborados, se añade a cada tubo de eppendorf 3 ml del reactivo de Bradford, se agita en el vórtex y se deja incubar a temperatura ambiente durante dos minutos. Después de esto en un periodo no mayor a una hora se miden las absorbancias a una longitud de 595 nm. A partir de estos datos podemos obtener la recta de regresión con su correspondiente índice de correlación y pendiente.

A continuación se hace lo propio con las muestras en lugar de la BSA obteniendo los valores de absorbancia que son interpolados con la recta de regresión, obtenida en la calibración, para calcular la cantidad de proteínas presentes en cada una. Los resultados se expresan en g/ml de muestra utilizada.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico de los datos se realizó empleando el programa SPSS, v24; (SPSS Inc., Chicago, IL.) para Windows.

La medida de tendencia central fue la media aritmética, que es la suma de los valores dividida por el número de casos. La medida de dispersión fue el error estándar de la media.

Debido a la necesidad de comparar 4 grupos entre ellos mismos utilizamos el análisis de la varianza que contrasta todos los casos a la vez.

Se ha utilizado un Modelo Lineal General Multivariante de medidas repetidas para analizar las diferencias en aquellos datos que tienen dos variables independientes. Estas medidas son las que incluyen el factor tiempo en semanas: glucemias basales, test de sobrecarga de glucosa y el peso. Si se especifican factores inter-sujetos, éstos dividen la población en grupos. Utilizando este procedimiento de Modelo Lineal General, se puede contrastar hipótesis nulas sobre los efectos tanto de los factores inter-sujetos como de los factores intra-sujetos. También permite analizar las

posibles interacciones entre variables además del efecto individual de cada una. Para contrastar los datos obtenidos por este análisis se realizó un ANOVA de un factor para las medidas de cada semana.

Para las determinaciones puntuales en las que el tiempo no es una variable independiente utilizamos el ANOVA de un factor. Estas son las determinaciones de insulina, GR, GPx y MDA. La hipótesis nula indicaría que todas las medias son iguales. El test se interpreta utilizando el valor  $p$ , de tal forma que para un valor de  $p < 0,05$  rechazamos la hipótesis de igualdad entre las medias. lo que permitiría concluir que significativamente las medias entre los distintos grupos no son iguales.

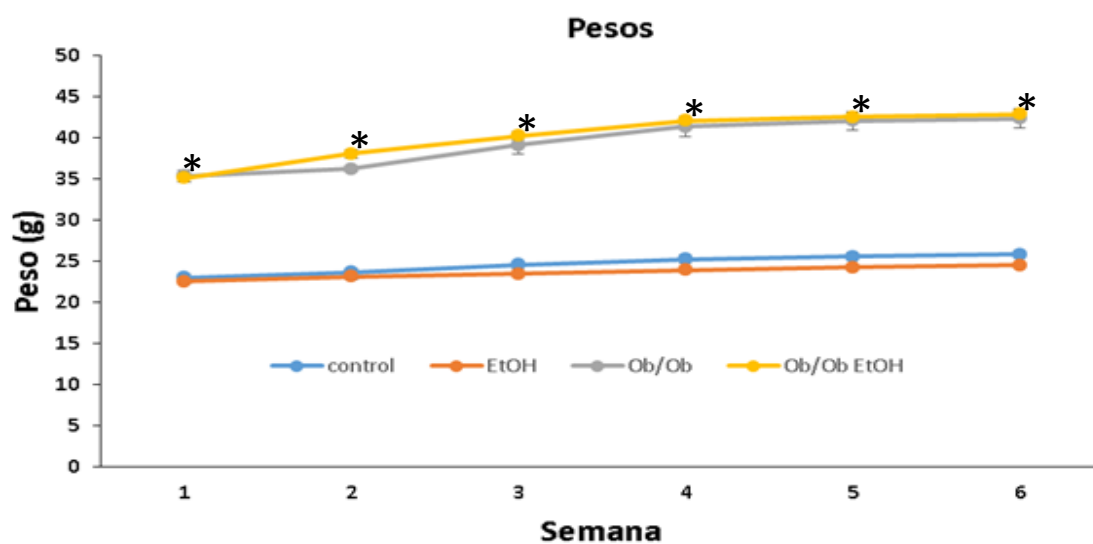
En este caso sería necesario posteriormente llevar a cabo un contraste post hoc que permite determinar cuales son los grupos concretos entre los que se encuentran diferencias.



## RESULTADOS

### DETERMINACIÓN DE LOS PESOS

En la figura 8 se muestran se representan los valores medios del peso junto con las desviaciones estándar en forma de intervalo de confianza de los cuatro grupos a estudio durante un periodo de 6 semanas. Se observan diferencias significativas entre los ratones de cada estirpe, con y sin mutación en el gen de la leptina.

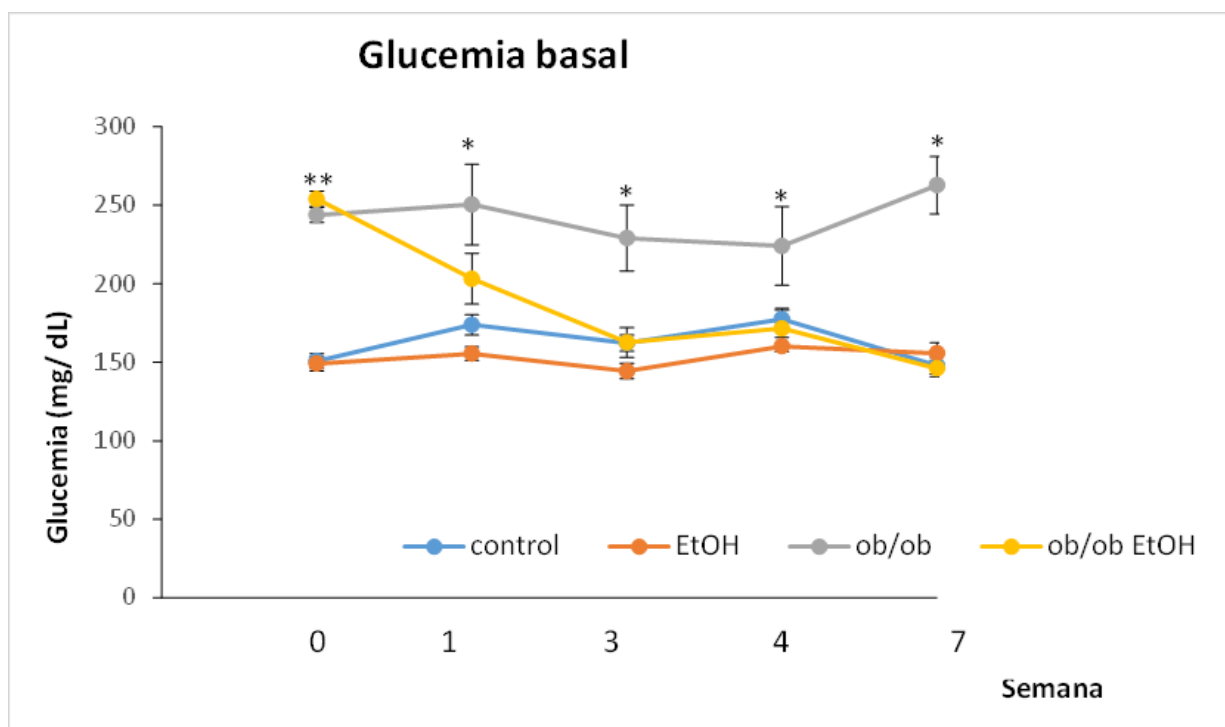


**Figura 8.** Pesos de los 4 grupos durante las primeras cuatro semanas

\* $p < 0,05$  vs control y EtOH

## DETERMINACIÓN DE LA GLUCEMIA BASAL

En la figura 10 se representan los valores medios de glucemia basal junto con sus errores estándares de la media en forma de intervalos de confianza. Se midieron semanalmente, mostrándose los resultados correspondientes a las semanas (0 (previo al inicio del consumo de etanol), 1, 3, 4 y 7.). Los grupos *Ob/ob* y *Ob/ob EtOH* partieron en la semana previa al consumo de etanol desde los mismos valores, al igual que lo hicieron los grupos *Control* y *EtOH*. No se encontraron diferencias significativas entre el grupo *Control* y *EtOH* a lo largo del experimento. Sin embargo, si se encontraron diferencias en las concentraciones entre el grupo *Ob/ob* y *Ob/ob-EtOH* a partir de la primera semana de consumo de etanol, disminuyendo los valores de este último grupo. Los valores del grupo *Ob/ob-EtOH* descendieron a partir de la semana 3 hasta valores parejos a los de los grupos *Control* y *EtOH*.



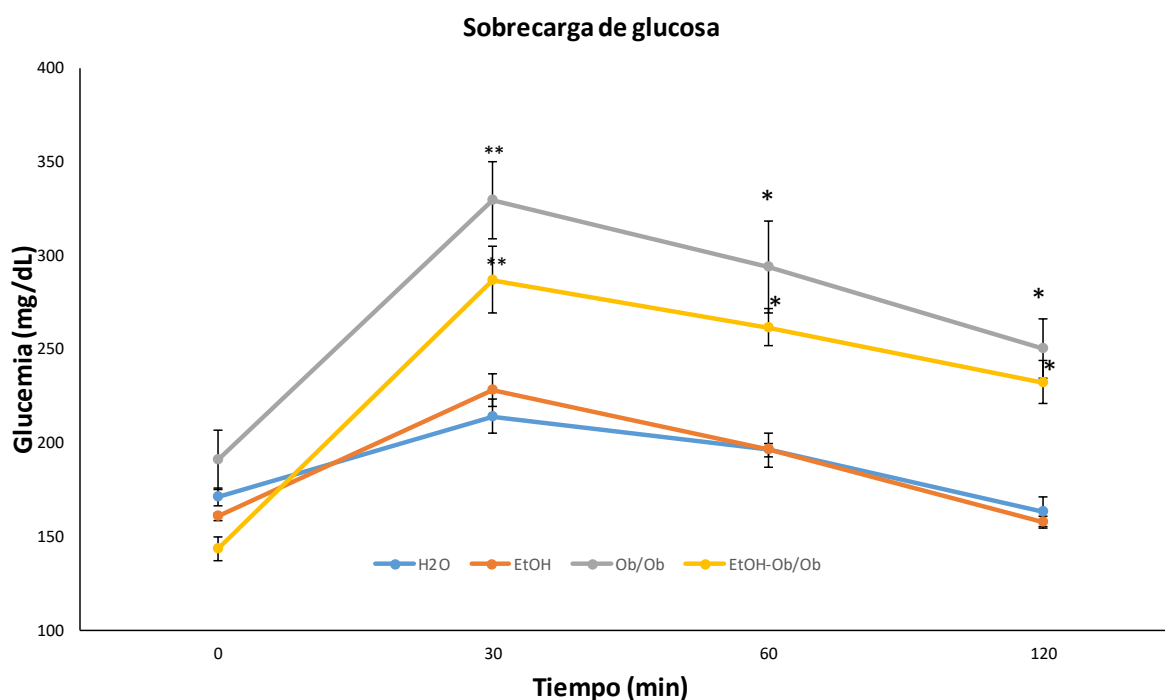
**Figura 9.** Glucemias basales semanales en cada grupo

\*  $p < 0,05$  vs resto de grupos, \*\*  $p < 0,05$  vs control y EtOH



## DETERMINACIÓN DEL TEST DE SOBRECARGA DE GLUCOSA

En la figura 10 están representados los valores medios de glucemia del test de sobrecarga junto con sus respectivos errores estándar de la media en forma de intervalos de confianza. Los valores de glucemia se midieron en el minuto 0, 30, 60 y 90 para todos los grupos. Se observa una diferencia significativa entre el grupo *ob/ob* y el grupo *EtOH-ob/ob*, siendo inferiores los valores de glucosa en este último grupo. En los animales *C57BL/6* no se observan diferencias significativas entre el grupo control y el *EtOH*.

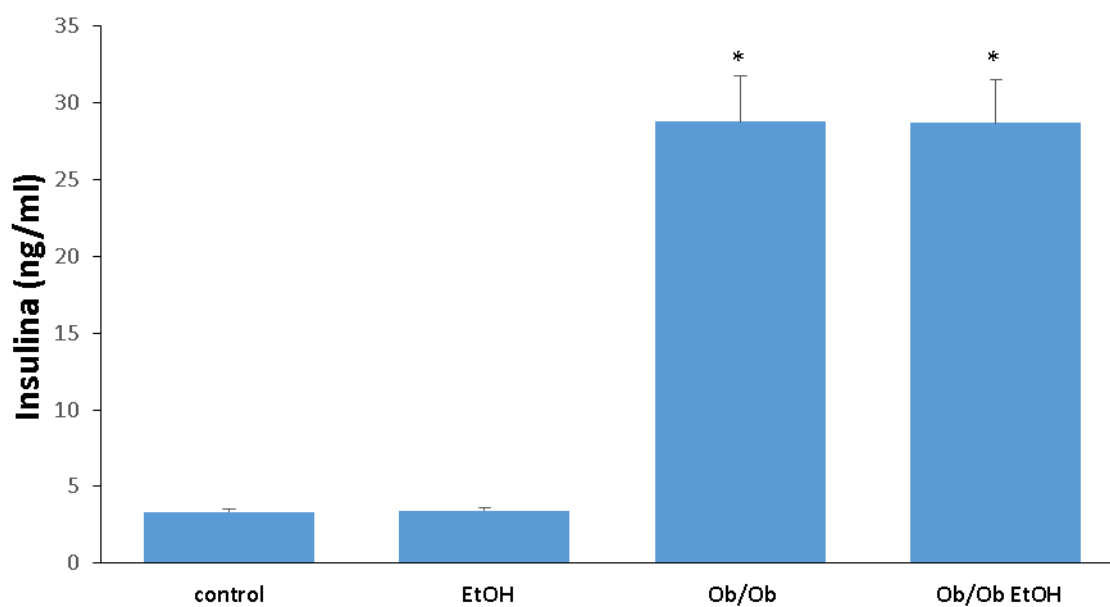


**Figura 10.** Glucemias del test de sobrecarga.

\*  $p < 0.05$  vs all groups, \*\*  $p < 0.05$  vs H2O y EtOH

## DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE INSULINA

En la figura 11 se representan los valores medios de secreción de insulina. Se tomaron las muestras antes del sacrificio. Se observan diferencias significativas entre los animales *ob/ob* y *C57BL/6*, mostrando concentraciones plasmáticas superiores de insulina los sujetos obesos. Sin embargo, no se observan diferencias significativas entre los grupos *Control* y *EtOH*, ni entre los grupos *Ob/ob* y *Ob/ob-EtOH*.

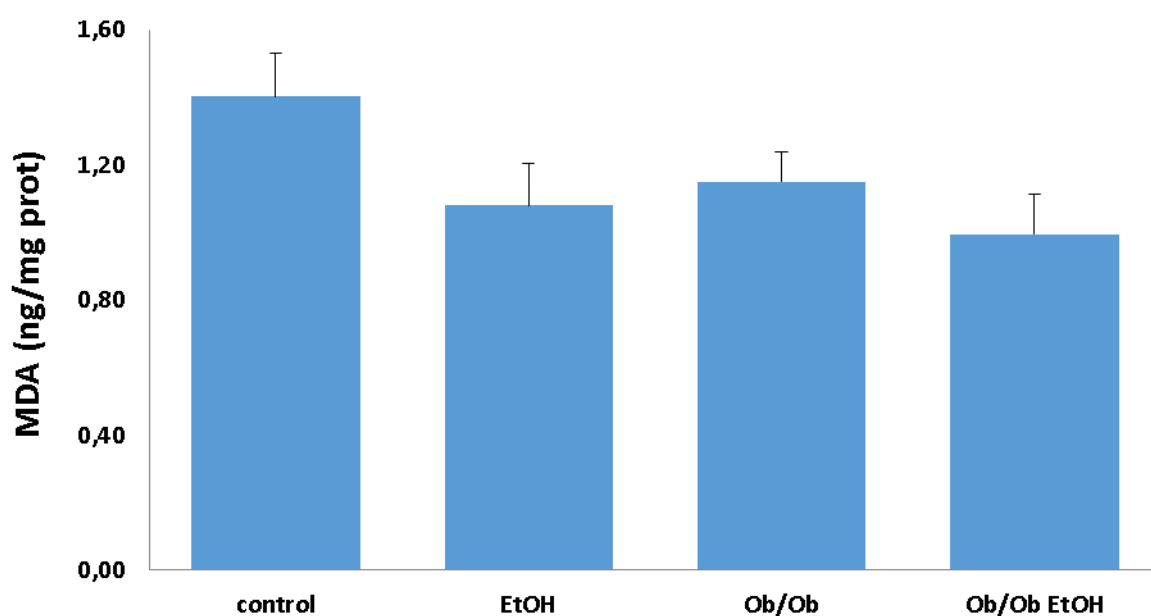


**Figura 11.** Concentración plasmática de insulina

\*  $p < 0.05$  vs Control y EtOH

## DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE MDA

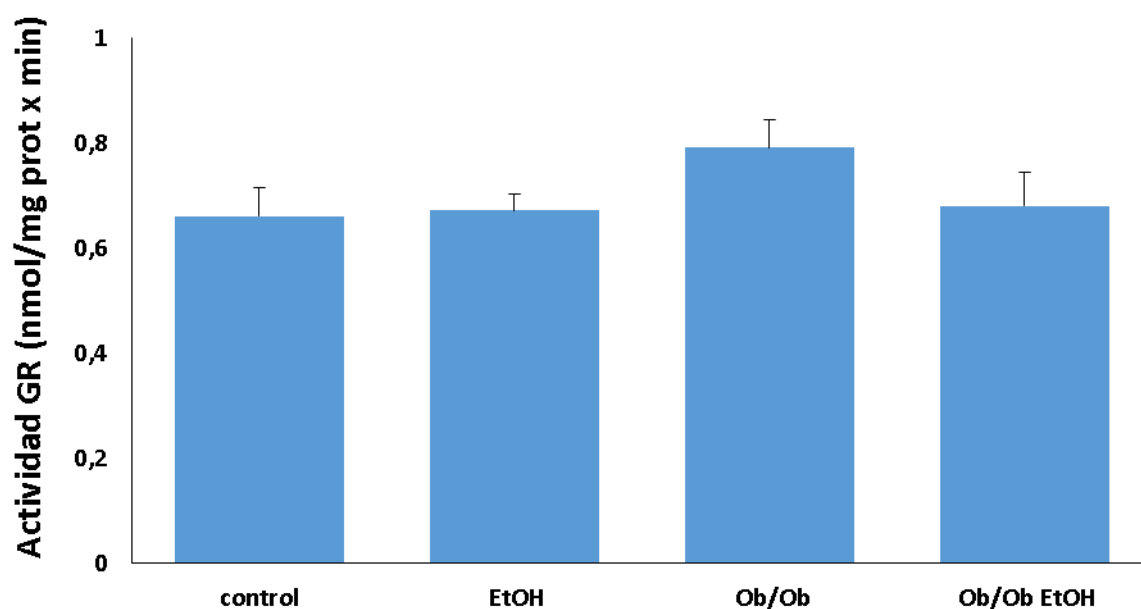
Las concentraciones de MDA se muestran en la figura 12. Las concentraciones están estandarizadas por miligramos de proteína. Estos valores en los grupos *EtOH* y *Ob/ob-EtOH* se observan ligeramente disminuidos comparados con sus respectivos controles. No obstante, las diferencias no son significativas, por lo que en este plazo de tiempo no se puede afirmar que el consumo de etanol tenga un efecto sobre los niveles de MDA.



**Figura 12.** Niveles de monoaldehído en corteza cerebral.

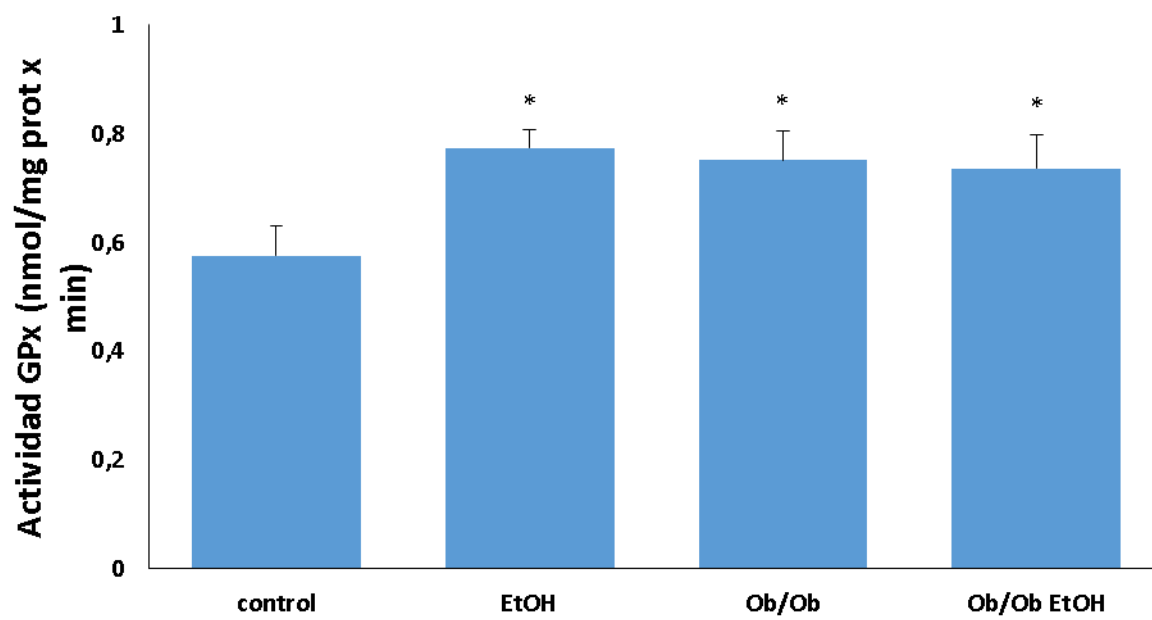
## DETERMINACIÓN DE LA DEFENSA ANTIOXIDANTE

Los niveles de actividad antioxidante se basan en las medidas de Glutación reductasa y Glutación peroxidasa en el tejido cortical y se muestran sus valores medios para cada grupo en la figura 13. La actividad se estandariza por miligramo de proteína y minuto. Se observa que los valores de GR presentan un ligero aumento en el grupo *Ob/ob*.



**Figura 13.** Niveles de Glutación reductasa estandarizados por mg de proteína y minuto.

En cuanto a los valores de GPx de la gráfica 14 se observan diferencias significativas que muestran un aumento en los grupos que tienen un agente inductor de estrés oxidativo adicional como son los grupos *EtOH*, *Ob/ob* y *Ob/ob-EtOH*. El nivel de significación establecido  $p < 0,05$ .



**Figura 14.** Niveles de Glutación peroxidasa estandarizados por mg de proteína y minuto.

\*  $p < 0,05$  vs control



## **DISCUSIÓN**

El principal objetivo del estudio es analizar el efecto sobre el SNC del consumo de etanol en ratones con síndrome metabólico. Este experimento se encuentra dentro de un proyecto que aúna el análisis de la conducta, los cambios metabólicos, la defensa antioxidante, la inflamación y la muerte celular. El efecto conjunto de ambas patologías sobre el SNC no cuenta con mucha bibliografía en la actualidad, y la que hay se muestra heterogénea. De ahí la importancia de este estudio.

En este experimento en particular se han analizado 4 grupos distintos de ratones, combinando las variables obesidad/SM e ingesta de etanol junto con sus respectivos negativos, con el fin de corroborar la hipótesis de un efecto beneficioso del consumo de etanol sobre el tejido neural. Para ello hemos determinado en todos los grupos valores metabólicos plasmáticos y parámetros que permiten valorar el estado oxidativo de la corteza cerebral de dichos animales.

Los resultados obtenidos apoyan un posible efecto beneficioso del consumo de etanol en los sujetos obesos en cuanto a su aumento de sensibilidad a la insulina sin aumentar la concentración de esta.

### **Valoración del peso de los animales.**

La elección del modelo animal a utilizar para el experimento es algo esencial, pues conseguir uno que se adapte a la complejidad de la DM2/SM en humanos es difícil. La predisposición a la resistencia insulínica y/o a la disfunción de células  $\beta$  se hereda de forma poligénica (Bell et al. 2001) aunque los factores medioambientales como la alimentación y la actividad física pueden desarrollar tanto casos de penetrancia incompleta como, al contrario, jugar un papel diabetogénico que dé lugar a fenocopias (Lander et al. 1994).

La gran relación entre la obesidad con su consiguiente RI es el prelude más habitual de la DM2 humana. Esto explica el uso de animales obesos para el estudio de la enfermedad humana. En este experimento se han utilizado como modelo de SM a ratas *ob/ob*. Estas son portadoras de una mutación espontánea en el gen de la leptina. (Zhang et al. 1994; Chua et al. 1996).

Como se observa en la Figura 8 los ratones *ob/ob* tienen un peso en gramos claramente superior al de la estirpe control (C57BL/6), como se ha detallado en estudios anteriores (Kennedy et al. 2010) sin que se observe un efecto significativo del etanol en ninguna de las dos estirpes. En un experimento más largo en el tiempo es posible que se acabasen mostrando diferencias entre los grupos con consumo de etanol y sus respectivos controles.

### **Valoración del metabolismo de la glucosa**

Como se observa en la Figura 11, la secreción de insulina es más elevada en los ratones obesos, existiendo una hiperinsulinemia en estos animales, que coincide con los encontrados en otros estudios con determinaciones en esta misma estirpe (Dalpé-Scotte et al. 1983; Bégin-Heick et al. 1979).

En relación al consumo de etanol, en la bibliografía actual existe controversia acerca del efecto del etanol sobre la secreción de insulina (aumento o reducción) en las células beta pancreáticas.

Se sabe que el **etanol agudo** es capaz de incrementar los valores intracelulares de cAMP a través de una vía dependiente de  $Ca^{2+}$  (Baliño et al. 2014; Verkhatsky et al. 2005) y a su vez que la vía iniciadora de la secreción de insulina en las células beta está mediada por la entrada de calcio. La PKA en su lugar forma parte de la vía amplificadora de secreción y su aumento está producido por un aumento de cAMP a expensas de la acción de la adenilato ciclasa (AC) (Schwede et al. 2015).



Centrándonos en el **consumo crónico**, un aumento de insulina podría ser explicado como un mecanismo de defensa del organismo ante una inhibición en la secreción basal, aunque los procesos que subyacen a este proceso son inciertos (Kim et al. 2015). No obstante, varios estudios han demostrado un efecto negativo del etanol sobre la función de las células beta pancreáticas. Este daño sería secundario a una desregulación de la glucoquinasa (GCK). La GCK juega un papel importante en la homeostasis glucémica ya que actúa como sensor de glucosa para la secreción de insulina glucosa-mediada y como el mayor mediador en la captación de glucosa por los hepatocitos (Kim et al. 2007; Cullen et al. 2011). La hiperglucemia asociada a un descenso en los niveles de GCK conlleva un aumento en la producción de ERO (Kim et al. 2005). El aumento de ERO puede ser uno de los eventos más tempranos asociado con la disfunción mitocondrial, disfunción de las células beta y apoptosis (Kim et al. 2010).

En este sentido, es importante resaltar que la insulina regula el metabolismo mitocondrial a través de la vía de señalización de PI3K/AKT, y que la disminución de AKT inducida por una hiperinsulinemia/RI afecta profundamente a la función mitocondrial de las neuronas, induciendo a su vez estrés oxidativo. Recíprocamente, la disfunción mitocondrial y el consecuente EO pueden generar la aparición de RI (Anderson et al. 2009; Fisher-Wellman & Neuffer, 2012).

En nuestro estudio se muestra una evolución de los niveles de glucemia basal en los 4 grupos a lo largo de las 7 semanas de estudio (Figura 8). Entre el grupo *EtOH* y su *control* las diferencias no fueron significativas, dato que coincide con un reciente meta-análisis de estudios de intervención el cual concluye que el etanol no tiene efecto en la concentración de glucosa en población no diabética (Schriecks et al. 2015).

Respecto al grupo Ob/Ob y Ob/Ob EtOH, se observa que ambos parten de unos niveles de glucemia basal aumentados, como los encontrados en la bibliografía para la estirpe Ob/Ob (de

Groot T et al.2017; Tahara A et al. 2018). Esta característica que forma parte del descrito SM, definido por una obesidad central asociada a una RI (Kennedy et al. 2010). Sin embargo, el grupo Ob/Ob EtOH presenta un descenso significativo de la glucemia basal a lo largo de las 7 semanas respecto al grupo *Ob/ob*, corrigiendo niveles hasta alcanzar valores similares a los hallados en la estirpe no obesa a partir de la tercera semana.

Estos hallazgos junto con los datos encontrados en los valores de insulina, inducen a pensar que el mecanismo de descenso de glucosa en sangre es debido a un aumento de la sensibilidad a insulina por parte del consumo moderado de etanol. Dicha relación queda respaldada por la literatura (Fromenty et al. 2009; Nogueira et al. 2017).

En cuanto al test de sobrecarga de glucosa, los criterios que valoran la anormalidad de este tipo de prueba se basan en el pico de glucosa alcanzado entre los 30-60 minutos y la falta de retorno de la glucemia a valores de normalidad pasadas las primeras dos horas tras la ingestión.

Nuestros resultados (Figura 10) revelan en los grupos *Control*, *EtOH* y *Ob/ob* una curva similar a la reportada en estudios con machos *wistar* (Orozco-Tapia 2008; Bhandari et al. 2007; Redd et al. 2003) así como una concentración pico a los treinta minutos concordante con los datos hallados en la literatura (Bhandari et al. 2007; Fernandez-Twinn et al.2005).

Sin embargo, en el grupo *Ob/ob-EtOH* observamos una diferencia significativa en los valores de glucemia con respecto a su control (*Ob/ob*), los cuales están disminuidos. Esto corrobora los datos obtenidos en las glucemias basales, indicando un efecto del etanol en la disminución de la RI (Kawamoto et al. 2009; Fueki et al. 2007), a pesar de existir una hiperinsulinemia en este grupo (Figura 11).

## Valoración del estado oxidativo

Los radicales libres son moléculas que contienen en su capa electrónica al menos un electrón desapareado. Esto hace que sean inestables y tiendan a agregarse con distintas moléculas que le rodeen formando un aducto estable (Karlsson, 1997). Cualquier RL con un oxígeno en su estructura puede considerarse una ERO. Estos afectan a muchos mecanismos celulares, mediante alteraciones en macromoléculas vitales como el ADN, proteínas y/o lípidos de membrana.

Debido a la gran inestabilidad de los RL, el EO in vivo se puede medir indirectamente mediante el uso de diferentes biomarcadores que son producto de la reacción de aquellos con las principales macromoléculas. En este estudio hemos escogido el MDA (producto de la peroxidación lipídica) como marcador de daño oxidativo, el cual en la actualidad se mide con gran precisión determinado por la aparición espectrofotométrica del resultado del ensayo TBARS en el HPLC. Se sabe que esta es la mejor técnica para reflejar el índice de peroxidación lipídica de una muestra biológica (Esterbauer et al. 1990).

Para confirmar una situación de EO, además de comprobar la presencia de daño oxidativo, es importante el estudio de las defensas antioxidantes. En concreto, hemos estudiado la actividad de las enzimas Glutathion peroxidasa y Glutathion reductasa.

El etanol es una sustancia ampliamente consumida en nuestro medio, su mecanismo tóxico se basa, entre otros, en la producción de RL o sus metabolitos en diversos tejidos. En tejido nervioso, las alteraciones observadas están muy ligadas al aumento de estos RL (Bosch-Morell et al. 1998). Un estudio actual de hecho, propone que el efecto inductor del etanol sobre la CYP2E1 es capaz de aumentar la producción de ERO, lo cual activa factores de transcripción sensibles a la oxidación como el Nrf2 (Nuclear related factor 2), y conducir a la expresión de CYP2A5 (Lu et al. 2018). También está demostrado que el abuso de etanol implica un aumento de la peroxidación lipídica y sus respectivos productos y con ello una disminución de factores antioxidantes como el GSH y sus

enzimas derivadas (Fernández-Checa, 2003). Además, el etanol está asociado a daño mitocondrial lo que resulta en una disminución en la producción de ATP (Koch et al. 2004).

Por su parte, la obesidad se ha relacionado tanto en humanos (Olusi, 2002) como en modelos animales obesos (Furukawa et al. 2004) con una disminución en la actividad de enzimas antioxidantes como la GPx y un aumento de ERO.

En el presente estudio se observa (Figuras 13 y 14) que los valores de actividad GR solo muestran una pequeña elevación en el grupo Ob/ob EtOH que no tiene significación estadística en relación al resto de grupos del estudio. Sin embargo, la actividad GPx sí se encuentra elevada en los grupos que a priori podrían estar sometidos a una agresión por parte de agentes prooxidantes (*EtOH*; *Ob/ob*; *Ob/ob- EtOH*), lo que puede indicar un aumento de las defensas antioxidantes como mecanismo compensatorio ante las diferentes agresiones oxidativas.

Así, el análisis estadístico indica un aumento de la actividad GPx y unos valores de actividad GR que no se modifican con la variable etanol. Este hecho podría llevar a una sobreproducción de GSSG y una disminución en los niveles de GSH en el córtex. Alterando el equilibrio entre GSH y GSSG que es el principal determinante del estado oxidativo del organismo humano (Waly et al., 2012).

El sistema glutatión es conocido como una de las defensas antioxidantes celulares más importante debido a su capacidad para atrapar ERO y frente a la peroxidación lipídica (Van Vleet et al., 1981). Las ERO reaccionan normalmente con lípidos lo que desencadena una peroxidación lipídica. El SNC es un órgano rico en ácidos grasos por lo que esta peroxidación resulta en un aumento de MDA o 4-HNE. Este proceso se ha descrito ampliamente en pacientes con SM como tras el abuso de etanol (Miranda et al. 2007; Johnsen-Soriano et al. 2007). Estos productos son capaces de formar aductos que además conllevan alteraciones en el ADN y proteínas (Dizdaroglu et al. 2012).

El MDA es el principal producto de la peroxidación lipídica, siendo el incremento de su concentración indicativo de una posible situación de EO (Halliwell, 2000). En cuanto a las determinaciones de MDA obtenidas por HPLC, se observa que al cabo del experimento no se han encontrado diferencias estadísticas entre los grupos (figura 12).

El hecho de que en el presente estudio no se hayan llegado a observar incrementos significativos en la concentración de MDA en los grupos *Ob/ob* o *Ob/ob EtOH* puede responder a una duración insuficiente del experimento. Esto se basaría en que los niveles de MDA en las neuronas corticales se elevarían cuando el sistema de protección antioxidante se haya visto sobrepasado y no sea capaz de neutralizar la agresión oxidativa, estableciéndose por tanto una situación de EO a partir de ese momento.

## CONCLUSIONES

Con los resultados de este estudio, podemos concluir que el consumo de etanol no ha tenido efecto sobre la secreción de insulina. Sin embargo, podemos concluir que el etanol ha mejorado de manera significativa la sensibilidad a la insulina en el grupo con síndrome metabólico como han mostrado los resultados en las glucemias y el test de sobrecarga.

Por otro lado, en cuanto al estado oxidativo, podemos concluir que ha habido un aumento del estrés oxidativo en los grupos con obesidad y consumo de etanol, reflejado en un incremento significativo de la actividad en la glutatión peroxidasa, con respecto al grupo control.

## LIMITACIONES

Este experimento no está exento de limitaciones. La primera de ellas es la medición de las glucemias basales. Pese a utilizar el mismo método para todas, los resultados de las mediciones en las semanas 2, 5 y 6 no fueron congruentes con las demás por lo que se descartaron las determinaciones de estas semanas.

Otra gran limitación es la ausencia de niveles de alcoholemia en los ratones. En futuras investigaciones se pretende obtenerlas mediante cromatografía. No obstante, en otros estudios se ha demostrado que las concentraciones de alcoholemia para ambos genotipos son iguales ante el mismo patrón de ingesta.

Por último, este experimento se engloba dentro de un proyecto mayoren el que se pretenden determinar a parte de los efectos sobre el metabolismo de la glucosa y las defensas antioxidantes, cambios en la conducta, en el estado inflamatorio y en la muerte celular. Alargando el tiempo de estudio a más semanas podríamos esperar encontrar un aumento en la producción de MDA en los grupos obeos y alcohólicos. También podríamos apreciar cambios en la secreción de insulina que demostrasen una evolución de los islotes de Langerhans hacia un estado diabético. Aunque todo esto queda como especulaciones a espera de continuar con el proyecto.

## BIBLIOGRAFÍA

Almansa I, Barcia JM, López-Pedrajas R, Muriach M, Miranda M, Romero FJ. (2013) Naltrexone reverses ethanol-induced rat hippocampal and serum oxidative damage. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;296898.

Almansa I, Barcia JM, López-Pedrajas R, Muriach M, Miranda M, Romero FJ. Naltrexone reverses ethanol-induced rat hippocampal and serum oxidative damage. *Oxid Med Cell Longev*. 2013; 296898

Almansa I, Fernández A, García-Ruiz C, Muriach M, Barcia JM, Miranda M, Fernández-Checa JC, Romero FJ. Brain mitochondrial alterations after chronic alcohol consumption. *J Physiol Biochem*. 2009; 65:305-312.

Anderson EJ, Lustig ME, Boyle KE, Woodlief TL, Kane DA, Lin CT, Price JW 3rd, Kang L, Rabinovitch PS, Szeto HH, Houmard JA, Cortright RN, Wasserman DH, Neuffer PD. Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. *J Clin Invest*. 2009; 119:573-81.

Ascaso JF, González-Santos P, Hernández Mijares A, Mangas Rojas A, Masana Marín L, Millán Núñez-Cortés JL, Pallardo LF, Pedro-Botet J, Pérez-Jiménez F, Pintó X, Plaza I, Rubiés-Prat J, Zúñiga M. Diagnóstico de síndrome metabólico. Adecuación de los criterios diagnósticos en nuestro medio. Recomendaciones del foro HDL. Resumen ejecutivo. *Rev Clí Esp*. 2006; 206:576-582.

Baliño P, Ledesma JC, Aragon CM. In vivo study of ethanol-activated brain protein kinase A: manipulations of Ca<sup>2+</sup> distribution and flux. *Alcohol Clin Exp Res*. 2014; 38:629-40.

Bégin-Heick N, Heick HM, Norman MG. Regranulation of islets of Langerhans and normalization of in vivo insulin secretion in ob/ob mice treated with oxytetracycline. *Diabetes*. 1979; 28:65-70

Bell GI, Polonsky KS. Diabetes mellitus and genetically programmed defects in beta-cell function. *Nature*. 2001; 414:788-91.

Benedict C, Hallschmid M, Hatke A, Schultes B, Fehm HL, Born J, Kern W. Intranasal insulin improves memory in humans. *Psychoneuroendocrinology*. 2004; 29:1326-1334.

Beulens JW, van der Schouw YT, Moons KG, Boshuizen HC, van der A DL, Groenwold RH. Estimating the mediating effect of different biomarkers on the relation of alcohol consumption with the risk of type 2 diabetes. *Ann Epidemiol*. 2013; 23:193-7.

Bhandari U, Jain N, Pillai KK. Further studies on antioxidant potential and protection of pancreatic beta-cells by *Embelia ribes* in experimental diabetes. *Exp Diabetes Res*. 2007; 2007:15803.

Biessels GJ, Kappelle AC, Bravenboer B, Erkelens DW, Gispen WH. Cerebral function in diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1994; 37:643-650.

Biswas SK. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 5698931.

Bocarsly ME, Fasolino M, Kane GA, LaMarca EA, Kirschen GW, Karatsoreos IN, McEwen BS, Gould E. Obesity diminishes synaptic markers, alters microglial morphology, and impairs cognitive function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 12:15731-15736.

Bosch-Morell F, Martínez-Soriano F, Colell A, Fernández-Checa JC, Romero FJ. Chronic ethanol feeding induces cellular antioxidants decrease and oxidative stress in rat peripheral nerves. Effect of S-adenosyl-L-methionine and N-acetyl-L-cysteine. *Free Radic Biol Med*. 1998; 25:365-8.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72:248-254.

Cai D, Liu T. Inflammatory cause of metabolic syndrome via brain stress and NF- $\kappa$ B. *Aging*. 2012; 4:98-115.

Chiang CP, Wu CW, Lee SP, Chung CC, Wang CW, Lee SL, Nieh S, Yin SJ. Expression pattern, ethanol-metabolizing activities, and cellular localization of alcohol and aldehyde dehydrogenases in human pancreas: implications for pathogenesis of alcohol-induced pancreatic injury. *Alcohol Clin Exp Res*. 2009; 33:1059-68.

Chua SC Jr, Chung WK, Wu-Peng XS, Zhang Y, Liu SM, Tartaglia L, Leibel RL. Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. *Science*. 1996; 271:994-6



Cullen KS, Matschinsky FM, Agius L, Arden C. Susceptibility of glucokinase-MODY mutants to inactivation by oxidative stress in pancreatic  $\beta$ -cells. *Diabetes*. 2011; 60: 3175-3185

Dalpé-Scott M, Heick HM, Bégin-Heick N. Insulin secretion in the obese (ob/ob) mouse. The effect of oxytetracycline on insulin release. *Diabetes*. 1983; 32:932-7.

de Groot T, Damen L, Kosse L, Alsady M, Doty R, Baumgarten R, Sheehan S, van der Vlag J, Korstanje R, Deen PMT. Lithium reduces blood glucose levels, but aggravates albuminuria in BTBR-ob/ob mice. *PLoS One*. 2017; 12:e0189485.

Dizdaroglu M, Jaruga P. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Res*. 2012; 46:382-419.

Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol*. 1990; 186:407-21.

Fernández-Checa JC. Alcohol-induced liver disease: when fat and oxidative stress meet. *Ann Hepatol*. 2003; 2:69-75.

Fernandez-Twinn DS, Wayman A, Ekizoglou S, Martin MS, Hales CN, Ozanne SE. Maternal protein restriction leads to hyperinsulinemia and reduced insulin-signaling protein expression in 21-month-old female rat offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005; 288:R368-73.

Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med*. 2006; 36:327-58.

Fisher-Wellman KH, Neufer PD. Linking mitochondrial bioenergetics to insulin resistance via redox biology. *Trends Endocrinol Metab*. 2012 Mar; 23:142-53.

Freiherr J, Hallschmid M, Frey WH 2nd, Brünner YF, Chapman CD, Hölscher C, Craft S, De Felice FG, Benedict C. Intranasal insulin as a treatment for Alzheimer's disease: a review of basic research and clinical evidence. *CNS Drugs*. 2013; 27:505-514.

Fromenty B, Vadrot N, Massart J, Turlin B, Barri-Ova N, Lett ron P, Fautrel A, Robin MA. Chronic ethanol consumption lessens the gain of body weight, liver triglycerides, and diabetes in obese ob/ob mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009; 331:23-34.

Fueki Y, Miida T, Wardaningsih E, Ito M, Nakamura A, Takahashi A, Hanyu O, Tsuda A, Saito H, Hama H, Okada M. Regular alcohol consumption improves insulin resistance in healthy Japanese men independent of obesity. *Clin Chim Acta*. 2007; 382:71-6.

Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2004; 114:1752-61.

Grundey SM, Brewer HB Jr, Cleeman JI, Smith SC Jr, Lenfant C; American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation*. 2004; 109:433-8.

Gupta S, Warner J. Alcohol-related dementia: a 21st-century silent epidemic? *Br J Psychiatry*. 2008; 193:351-353.

Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans*. 2007; 35:1147-50.

Halliwell B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? *Cardiovasc Res*. 2000; 47:410-8.

Hayden MR, Tyagi SC. Intimal redox stress: accelerated atherosclerosis in metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *Atheroscleropathy. Cardiovasc Diabetol*. 2002; 1:3.

Heianza Y, Arase Y, Saito K, Tsuji H, Fujihara K, Hsieh SD, Kodama S, Shimano H, Yamada N, Hara S, Sone H. Role of alcohol drinking pattern in type 2 diabetes in Japanese men: the Toranomon Hospital Health Management Center Study 11 (TOPICS 11). *Am J Clin Nutr*. 2013; 97:561-8.

Heni M, Kullmann S, Preissl H, Fritsche A, H ring HU. Impaired insulin action in the human brain: causes and metabolic consequences. *Nat Rev Endocrinol*. 2015; 11:701-711.

Holst C, Becker U, Jørgensen ME, Grønbaek M, Tolstrup JS. Alcohol drinking patterns and risk of diabetes: a cohort study of 70,551 men and women from the general Danish population. *Diabetologia*. 2017; 60:1941-1950.6

Ix JH, Wassel CL, Kanaya AM, Vittinghoff E, Johnson KC, Koster A, Cauley JA, Harris TB, Cummings SR, Shlipak MG; Health ABC Study. Fetuin-A and incident diabetes mellitus in older persons. *JAMA*. 2008; 300:182-8.

Johnsen-Soriano S, Bosch-Morell F, Miranda M, Asensio S, Barcia JM, Romá J, Monfort P, Felipe V, Romero FJ. Ebselen prevents chronic alcohol-induced rat hippocampal stress and functional impairment. *Alcohol Clin Exp Res*. 2007; 31:486-492.

Karlsson J. Introduction to nutraology and radical formation. In: *Antioxidants and Exercise*. Illinois: Human Kinetics Press. 1997; 1–143.

Kawamoto R, Kohara K, Tabara Y, Miki T, Ohtsuka N, Kusunoki T, Abe M. Alcohol consumption is associated with decreased insulin resistance independent of body mass index in Japanese community-dwelling men. *Tohoku J Exp Med*. 2009; 218:331-7.

Kelm MK, Criswell HE, Breese GR. Calcium release from presynaptic internal stores is required for ethanol to increase spontaneous gamma-aminobutyric acid release onto cerebellum Purkinje neurons. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007; 323:356-64.

Kelm MK, Criswell HE, Breese GR. The role of protein kinase A in the ethanol-induced increase in spontaneous GABA release onto cerebellar Purkinje neurons. *J Neurophysiol*. 2008; 100:3417-28.

Kennedy AJ, Ellacott KL, King VL, Hasty AH. Mouse models of the metabolic syndrome. *Dis Model Mech*. 2010; 3:156-66.

Kim EH, Koh EH, Park JY, Lee KU. Adenine nucleotide translocator as a regulator of mitochondrial function: implication in the pathogenesis of metabolic syndrome. *Korean Diabetes J*. 2010; 34:146-53.

Kim JY, Lee DY, Lee YJ, Park KJ, Kim KH, Kim JW, Kim WH. Chronic alcohol consumption potentiates the development of diabetes through pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction. *World J Biol Chem*. 2015; 6:1-15

Kim WH, Lee JW, Suh YH, Hong SH, Choi JS, Lim JH, Song JH, Gao B, Jung MH. Exposure to chronic high glucose induces betacell apoptosis through decreased interaction of glucokinase with mitochondria: downregulation of glucokinase in pancreatic betacells. *Diabetes* 2005; 54: 2602-2611

Kim WH, Lee JW, Suh YH, Lee HJ, Lee SH, Oh YK, Gao B, Jung MH. AICAR potentiates ROS production induced by chronic high glucose: roles of AMPK in pancreatic beta-cell apoptosis. *Cell Signal*. 2007; 19: 791-805

Koch OR, Pani G, Borrello S, Colavitti R, Cravero A, Farrè S, Galeotti T. Oxidative stress and antioxidant defenses in ethanol-induced cell injury. *Mol Aspects Med*. 2004; 25:191-8.

Koloverou E, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chrysoshoou C, Georgousopoulou EN, Pitaraki E, Metaxa V, Stefanadis C; ATTICA Study Group. 10-year incidence of diabetes and associated risk factors in Greece: the ATTICA study (2002-2012). *Rev Diabet Stud*. 2014; 11:181-9

Koppes LL, Dekker JM, Hendriks HF, Bouter LM, Heine RJ. Moderate alcohol consumption lowers the risk of type 2 diabetes: a meta-analysis of prospective observational studies. *Diabetes Care*. 2005; 28:719-25.

Kuzma E, Llewellyn DJ, Langa KM, Wallace RB, Lang IA. History of alcohol use disorders and risk of severe cognitive impairment: a 19-year prospective cohort study. *The American Journal of Geriatric psychiatry*. 2014; 22:1047-1054.

Lander ES, Schork NJ. Genetic dissection of complex traits. *Science*. 1994; 265:2037-48.

Lu Y, Cederbaum AI. Alcohol Upregulation of CYP2A5: Role of Reactive Oxygen Species. *React Oxyg Species (Apex)*. 2016; 1:117-130.

Marques-Vidal P, Vollenweider P, Waeber G. Alcohol consumption and incidence of type 2 diabetes. Results from the CoLaus study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2015; 25:75-84.

Martínez de Morentín BE, Rodríguez MC, Martínez JA. Síndrome metabólico, resistencia a la insulina y metabolismo tissular. *Endocrinología y Nutrición* 2003;50: 324-333

Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem*. 2005; 16:577-86.

Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem*. 1983; 52:711-60.

Mellendijk L, Wiesmann M, Kiliaan AJ. Impact of Nutrition on Cerebral Circulation and Cognition in the Metabolic Syndrome. *Nutrients*. 2015; 7:9416-9439.

Miranda M, Muriach M, Almansa I, Arnal E, Messeguer A, Díaz-Llopis M, Romero FJ, Bosch-Morell F. CR-6 protects glutathione peroxidase activity in experimental diabetes. *Free Radic Biol Med*. 2007; 43:1494-1498.

Muriach M, Bosch-Morell F, Alexander G, Blomhoff R, Barcia J, Arnal E, Almansa I, Romero FJ, Miranda M. Lutein effect on retina and hippocampus of diabetic mice. *Free Radic Biol Med*. 2006; 41:979-984.

Naqvi NH, Morgenstern J. Cognitive Neuroscience Approaches to Understanding Behavior Change in Alcohol Use Disorder Treatments. *Alcohol Res*. 2015; 37:29-38.

Nogueira LC, do Rio RF, Lollo PCB, Ferreira IMPLVO. Moderate Alcoholic Beer Consumption: The Effects on the Lipid Profile and Insulin Sensitivity of Adult Men. *J Food Sci*. 2017; 82:1720-1725.

Novak V, Milberg W, Hao Y, Munshi M, Novak P, Galica A, Manor B, Roberson P, Craft S, Abduljalil A. Enhancement of vasoreactivity and cognition by intranasal insulin in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2014; 37:751-759.

Ogino K, Wang DH. Biomarkers of oxidative/nitrosative stress: an approach to disease prevention. *Acta Med Okayama*. 2007; 61:181-9.

Olusi SO. Obesity is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation and depletion of erythrocyte cytoprotective enzymes in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2002; 26:1159-64

OMS. Informe mundial sobre la diabetes. 2016

Orozco-Tapia RI. Efecto de los ácidos grasos omega-3 (FA  $\omega$ -3) y linoleico conjugado (CLA) en la diabetes mellitus 2 (DM2) en ratas wistar. [Tesis]. México. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 2008.

Ott V, Benedict C, Schultes B, Born J, Hallschmid M. Intranasal administration of insulin to the brain impacts cognitive function and peripheral metabolism. *Diabetes Obes Metab*. 2012; 14:214-221.

Pascual M, Baliño P, Alfonso-Loeches S, Aragón CM, Guerri C. Impact of TLR4 on behavioral and cognitive dysfunctions associated with alcohol-induced neuroinflammatory damage. *Brain Behav Immun*. 2011; 25 Suppl 1:S80-91.

Pascual M, Baliño P, Aragón CM, Guerri C. Cytokines and chemokines as biomarkers of ethanol-induced neuroinflammation and anxiety-related behavior: role of TLR4 and TLR2. *Neuropharmacology*. 2015; 89:352-9.

Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*. 1995; 269:540-3.

Poyrazoglu S, Bas F, Darendeliler F. Metabolic syndrome in young people. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2014; 21:56-63.

Redd MG, Meszaros K, Roche E. Type 2 diabetes: gluco-lipo-toxicity and pancreatic  $\beta$ -cell. *Ars Pharmaceutica*. 2003; 44:313-332

Richard MJ, Guiraud P, Meo J, Favier A. High-performance liquid chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct in biological materials (plasma and human cells) using a commercially available reagent. *J Chromatogr*. 1992; 577:9-18.

Roberts CK, Hevener AL, Barnard RJ. Metabolic syndrome and insulin resistance: underlying causes and modification by exercise training. *Compr Physiol*. 2013; 3:1-58.

Ruderman N, Chisholm D, Pi-Sunyer X, Schneider S. The metabolically obese, normal-weight individual revisited. *Diabetes*. 1998; 47:699-713.

Schmitz-Peiffer C, Laybutt DR, Burchfield JG, Gurisik E, Narasimhan S, Mitchell CJ, Pedersen DJ, Braun U, Cooney GJ, Leitges M, Biden TJ. Inhibition of PKCepsilon improves glucose-stimulated insulin secretion and reduces insulin clearance. *Cell Metab.* 2007; 6:320-8.

Schrieks IC, Heil AL, Hendriks HF, Mukamal KJ, Beulens JW. The effect of alcohol consumption on insulin sensitivity and glycemic status: a systematic review and meta-analysis of intervention studies. *Diabetes Care.* 2015; 38:723-32.

Schütze M, Boeing H, Pischon T, Rehm J, Kehoe T, Gmel G, Olsen A, Tjønneland AM, Dahm CC, Overvad K, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Trichopoulou A, Benetou V, Zylis D, Kaaks R, Rohrmann S, Palli D, Berrino F, Tumino R, Vineis P, Rodríguez L, Agudo A, Sánchez MJ, Dorronsoro M, Chirlaque MD, Barricarte A, Peeters PH, van Gils CH, Khaw KT, Wareham N, Allen NE, Key TJ, Boffetta P, Slimani N, Jenab M, Romaguera D, Wark PA, Riboli E, Bergmann MM. Alcohol attributable burden of incidence of cancer in eight European countries based on results from prospective cohort study. *BMJ.* 2011; 342:d1584

Schwede F, Chepurny OG, Kaufholz M, Bertinetti D, Leech CA, Cabrera O, Zhu Y, Mei F, Cheng X, Manning Fox JE, MacDonald PE, Genieser HG, Herberg FW, Holz GG. Rp-cAMPS Prodrugs Reveal the cAMP Dependence of First-Phase Glucose Stimulated Insulin Secretion. *Mol Endocrinol.* 2015; 29:988-1005.

Shin JA, Lee JH, Lim SY, Ha HS, Kwon HS, Park YM, Lee WC, Kang MI, Yim HW, Yoon KH, Son HY. Metabolic syndrome as a predictor of type 2 diabetes, and its clinical interpretations and usefulness. *J Diabetes Investig.* 2013; 4:334-343.

Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med.* 1999; 27:916-21.

Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet.* 2005; 365:1333-46

Tahara A, Takasu T. Antidiabetic effects of SGLT2 inhibitor ipragliflozin in type 2 diabetic mice fed diets containing different carbohydrate contents. *Life Sci.* 2018; 197:80-90.

Van Vleet JF, Boon GD, Ferrans VJ. Induction of lesions of selenium-vitamin E deficiency in ducklings fed silver, copper, cobalt, tellurium, cadmium, or zinc: protection by selenium or vitamin E supplements. *Am J Vet Res.* 1981; 42:1206-17.

Verkhatsky A. Physiology and pathophysiology of the calcium store in the endoplasmic reticulum of neurons. *Physiol Rev.* 2005; 85:201-79.

Walker JM, Harrison FE. Shared Neuropathological Characteristics of Obesity, Type 2 Diabetes and Alzheimer's Disease: Impacts on Cognitive Decline. *Nutrients.* 2015; 7:7332-7357.

Waly MI, Hornig M, Trivedi M, Hodgson N, Kini R, Ohta A, Deth R. Prenatal and Postnatal Epigenetic Programming: Implications for GI, Immune, and Neuronal Function in Autism. *Autism Res Treat.* 2012; 2012:190930.

Wang C, Chan JS, Ren L, Yan JH. Obesity Reduces Cognitive and Motor Functions across the Lifespan. *Neural Plast.* 2016:2473081.

Wefers H, Sies H. Oxidation of glutathione by the superoxide radical to the disulfide and the sulfonate yielding singlet oxygen. *Eur J Biochem.* 1983; 137:29-36.

Xiao ZM, Li LJ, Yu SZ, Lu ZN, Li CY, Zheng JQ. Effects of extracellular Ca(2+) influx and intracellular Ca(2+) release on ethanol-induced cytoplasmic Ca(2+) overload in cultured superior cervical ganglion neurons. *Neurosci Lett.* 2005; 390:98-103

Yagihashi S, Inaba W, Mizukami H. Dynamic pathology of islet endocrine cells in type 2 diabetes:  $\beta$ -Cell growth, death, regeneration and their clinical implications. *J Diabetes Investig.* 2016; 7:155-65.

Yang JY, Xue X, Tian H, Wang XX, Dong YX, Wang F, Zhao YN, Yao XC, Cui W, Wu CF. Role of microglia in ethanol-induced neurodegenerative disease: Pathological and behavioral dysfunction at different developmental stages. *Pharmacol Ther.* 2014; 144:321-37.

Yarchoan M, Arnold SE. Repurposing diabetes drugs for brain insulin resistance in Alzheimer disease. *Diabetes.* 2014; 63:2253-2261.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994; 372:425-32.



Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*. 2001; 414:782-7.